

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of
the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- BLURRY OR ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLATED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY DARK BLACK AND WHITE PHOTOS
- UNDECIPHERABLE GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

NOTIFICATION OF ELECTION

(PCT Rule 61.2)

From the INTERNATIONAL BUREAU

To:

Assistant Commissioner for Patents
United States Patent and Trademark
Office
Box PCT
Washington, D.C. 20231
ÉTATS-UNIS D'AMÉRIQUE

in its capacity as elected Office

Date of mailing (day/month/year) 17 August 1999 (17.08.99)	Applicant's or agent's file reference 158-2 PCT
International application No. PCT/DE98/03543	Priority date (day/month/year) 28 November 1997 (28.11.97)
International filing date (day/month/year) 27 November 1998 (27.11.98)	
Applicant CICHUTEK, Klaus et al	

1. The designated Office is hereby notified of its election made:

☒ in the demand filed with the International Preliminary Examining Authority on:
18 June 1999 (18.06.99)

☐ in a notice effecting later election filed with the International Bureau on:

2. The election ☒ was
☐ was not

made before the expiration of 19 months from the priority date or, where Rule 32 applies, within the time limit under Rule 32.2(b).

The International Bureau of WIPO
34, chemin des Colombettes
1211 Geneva 20, Switzerland

Facsimile No.: (41-22) 740.14.35

Form PCT/IB/331 (July 1992)

Authorized officer

Sean Taylor

Telephone No.: (41-22) 338.83.38

2792480

THIS PAGE BLANK (USPTO)

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT
AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

PCT

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

(Artikel 18 sowie Regeln 43 und 44 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 158-2 PCT	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übermittlung des internationalen Recherchenberichts (Formblatt PCT/ISA/220) sowie, soweit zutreffend, nachstehender Punkt 5	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE 98/ 03543	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27/11/1998	(Frühestes) Prioritätsdatum (Tag/Monat/Jahr) 28/11/1997
Anmelder BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND letztvertreten ..et al.		

Dieser internationale Recherchenbericht wurde von der Internationalen Recherchenbehörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 18 übermittelt. Eine Kopie wird dem Internationalen Büro übermittelt.

Dieser internationale Recherchenbericht umfaßt insgesamt 4 Blätter.

☒ Darüber hinaus liegt ihm jeweils eine Kopie der in diesem Bericht genannten Unterlagen zum Stand der Technik bei.

1. Grundlage des Berichts

- a. Hinsichtlich der **Sprache** ist die internationale Recherche auf der Grundlage der internationalen Anmeldung in der Sprache durchgeführt worden, in der sie eingereicht wurde, sofern unter diesem Punkt nichts anderes angegeben ist.

☐ Die internationale Recherche ist auf der Grundlage einer bei der Behörde eingereichten Übersetzung der internationalen Anmeldung (Regel 23.1 b)) durchgeführt worden.

- b. Hinsichtlich der in der internationalen Anmeldung offenbarten **Nucleotid- und/oder Aminosäuresequenz** ist die internationale Recherche auf der Grundlage des Sequenzprotokolls durchgeführt worden, das

☒ in der internationalen Anmeldung in schriftlicher Form enthalten ist.

☒ zusammen mit der internationalen Anmeldung in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in schriftlicher Form eingereicht worden ist.

☐ bei der Behörde nachträglich in computerlesbarer Form eingereicht worden ist.

☒ Die Erklärung, daß das nachträglich eingereichte schriftliche Sequenzprotokoll nicht über den Offenbarungsgehalt der internationalen Anmeldung im Anmeldezeitpunkt hinausgeht, wurde vorgelegt.

☒ Die Erklärung, daß die in computerlesbarer Form erfaßten Informationen dem schriftlichen Sequenzprotokoll entsprechen, wurde vorgelegt.

2. ☒ Bestimmte Ansprüche haben sich als nicht recherchierbar erwiesen (siehe Feld I).

3. ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung (siehe Feld II).

4. Hinsichtlich der Bezeichnung der Erfindung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut von der Behörde wie folgt festgesetzt:

5. Hinsichtlich der Zusammenfassung

☒ wird der vom Anmelder eingereichte Wortlaut genehmigt.

☐ wurde der Wortlaut nach Regel 38.2b) in der in Feld III angegebenen Fassung von der Behörde festgesetzt. Der Anmelder kann der Behörde innerhalb eines Monats nach dem Datum der Absendung dieses internationalen Recherchenberichts eine Stellungnahme vorlegen.

6. Folgende Abbildung der Zeichnungen ist mit der Zusammenfassung zu veröffentlichen: Abb. Nr. 3

☐ wie vom Anmelder vorgeschlagen

☐ keine der Abb.

☒ weil der Anmelder selbst keine Abbildung vorgeschlagen hat.

☐ weil diese Abbildung die Erfindung besser kennzeichnet.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl der(die) Anspruch(üche) 11
sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen
K rpers bezieht(en), wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich
auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,
daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/86 C12N5/10 A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierte Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N A61K C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X ✓	WO 95 23846 A (UNIV MEDICINE & DENTISTRY OF N) 8. September 1995 siehe das ganze Dokument	10-18
X ✓	CHU T. H. ET AL.: "Toward highly efficient cell-type-specific gene transfer with retroviral vectors displaying single-chain antibodies." JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 71, Nr. 1, Januar 1997, Seiten 720-725, XP002103150 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument	10-18

-/--

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen☒ Siehe Anhang Patentfamilie

° Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen:

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

25. Mai 1999

Absenddatum des internationalen Recherchenberichts

04/06/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mandl, B

THIS PAGE BLANK (USPTO)

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie°	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A ✓	CHISWELL D. J. ET AL.: "PHAGE ANTIBODIES: WILL NEW 'COLICLONAL' ANTIBODIES REPLACE MONOCLONAL ANTIBODIES?" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, Bd. 10, Nr. 3, 1. März 1992, Seiten 80-84, XP000249633 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ----	1-9
A ✓	LANG I. M. ET AL.: "Recombinant rabbit Fab with binding activity to type-1 plasminogen activator inhibitor derived from a phage-display library against human alpha-granules" GENE, Bd. 172, Nr. 2, 26. Juni 1996, Seiten 295-298, XP002103151 siehe das ganze Dokument ----	1-9
A ✓	WO 93 01288 A (DEUTSCHES KREBSFORSCH) 21. Januar 1993 siehe das ganze Dokument ----	1-9
A ✓	EP 0 104 014 A (SLOAN KETTERING INST. CANCER) 28. März 1984 siehe das ganze Dokument ----	1-9
T ✓	JIANG A. ET AL.: "Cell-type-specific gene transfer into human cells with retroviral vectors that display single-chain antibodies." JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 72, Nr. 12, Dezember 1998, Seiten 10148-10156, XP002103152 siehe das ganze Dokument -----	10-18

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 98/03543

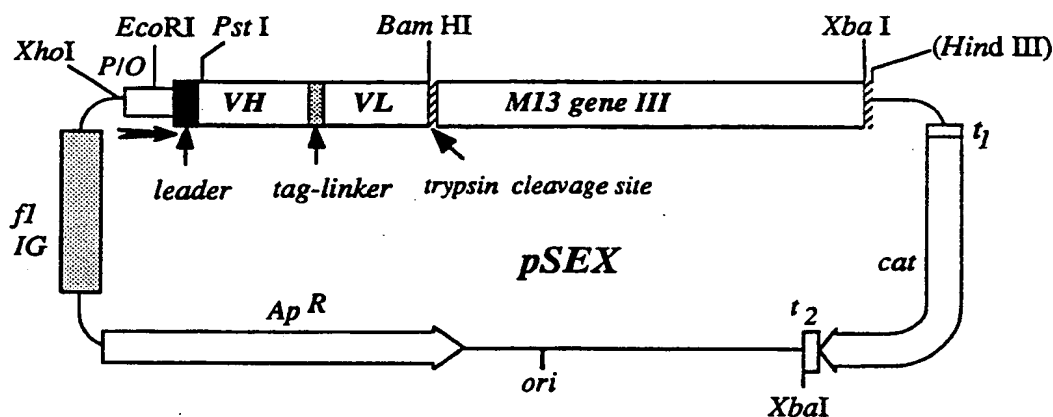
Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9523846	A	08-09-1995	CA 2184354 A	08-09-1995
			EP 0786010 A	30-07-1997
			JP 10501403 T	10-02-1998
			US 5869331 A	09-02-1999
WO 9301288	A	21-01-1993	DE 4122599 A	04-02-1993
			EP 0547201 A	23-06-1993
			JP 6500930 T	27-01-1994
			US 5849500 A	15-12-1998
EP 0104014	A	28-03-1984	US 4642291 A	10-02-1987
			CA 1210346 A	26-08-1986

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁵ : C12N 15/13, C12P 21/08 C12Q 1/68, C07K 15/28 G01N 33/53	A1	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 93/01288 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 21. Januar 1993 (21.01.93)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/EP92/01524 (22) Internationales Anmeldedatum: 6. Juli 1992 (06.07.92) (30) Prioritätsdaten: P 41 22 599.6 8. Juli 1991 (08.07.91) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): DEUTSCHES KREBSFORSCHUNGSZENTRUM STIFTUNG DES ÖFFENTLICHEN RECHTS [DE/DE]; Im Neuenheimer Feld 280, D-6900 Heidelberg (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): BREITLING, Frank [DE/DE]; Am Schloßberg 49, D-6900 Heidelberg (DE). LITTE, Melvyn [GB/DE]; Fritz-von Briesen-Str. 10, D-6903 Neckargemünd-Dilsberg (DE). DÜBELS, Stefan [DE/DE]; Quinckestr. 24, D-6900 Heidelberg (DE). BRAUNAGEL, Michael [DE/DE]; C 2, 1, D-6800 Mannheim 1 (DE). KLEWINGHAUS, Iris [DE/DE]; Richard-Wagner-Str. 30, D-6800 Mannheim (DE).		(74) Anwalt: MÜLLER-BORE & PARTNER; P.O. Box 26 02 47, D-8000 München 26 (DE). (81) Bestimmungsstaaten: JP, US, europäisches Patent (AT, BE, CH, DE, DK, ES, FR, GB, GR, IT, LU, MC, NL, SE). Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht.

(54) Title: PHAGEMIDE FOR SCREENING ANTIBODIES

(54) Bezeichnung: PHAGEMID ZUM SCREENEN VON ANTIKÖRPERN



(57) Abstract

A phagemide has been constructed that expresses an antibody merged to coliphage pIII protein. The phagemide is suitable for selecting specific antibodies from large gene banks with small quantities of antigen. The antibody-pIII gene can be strongly repressed, so that it allows antibody banks to be amplified without the danger of deletion mutants predominating. After induction, large quantities of the merged protein may be expressed.

(57) Zusammenfassung

Ein Phagemid wurde konstruiert, das einen an Coliphagen pIII Protein fusionierten Antikörper exprimiert. Das Phagemid eignet sich zur Selektion von spezifischen Antikörpern aus großen Genbanken unter Verwendung kleiner Mengen Antigen. Das Antikörper-pIII-Gen kann stark reprimiert werden, so daß Antikörper-Banken ohne Gefahr einer Dominanz von Deletionsmutanten amplifiziert werden können. Nach Induktion können große Mengen des fusionierten Proteins exprimiert werden.

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Code, die zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfhögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AT	Österreich	FI	Finnland	MN	Mongolei
AU	Australien	FR	Frankreich	MR	Mauritanien
BB	Barbados	GA	Gabon	MW	Malawi
BE	Belgien	GB	Vereinigtes Königreich	NL	Niederlande
BF	Burkina Faso	GN	Guinea	NO	Norwegen
BG	Bulgarien	GR	Griechenland	PL	Polen
BJ	Benin	HU	Ungarn	RO	Rumänien
BR	Brasilien	IE	Irland	RU	Russische Föderation
CA	Kanada	IT	Italien	SD	Sudan
CF	Zentrale Afrikanische Republik	JP	Japan	SE	Schweden
CG	Kongo	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	SN	Senegal
CH	Schweiz	KR	Republik Korea	SU	Soviet Union
CI	Côte d'Ivoire	LI	Liechtenstein	TD	Tschad
CM	Kamerun	LK	Sri Lanka	TC	Togo
CS	Tschechoslowakei	LU	Luxemburg	US	Vereinigte Staaten von Amerika
DE*	Deutschland	MC	Monaco		
DK	Dänemark	MG	Madagaskar		
ES	Spanien	ML	Mali		

1

5

Phagemid zum Screenen von Antikörpern

10 Die vorliegende Erfindung betrifft Phagemide zur Selektion
von spezifischen, aus großen Genbanken erhaltenen
Antikörpern, die Herstellung dieser Phagemide und ihre
Verwendung zur Selektion von spezifischen, aus großen
Genbanken erhaltenen Antikörpern unter Verwendung geringer
15 Mengen von Antigen.

Plasmid- und Phagen-Antikörper-Genbanken wurden in E.coli
von PCR-amplifizierten Immunglobulin-Familien nach
Immunisierung entwickelt. Rekombinante Antikörper gegen
20 Immunogene wurden durch ELISA-Tests der Bakterienüberstände
von isolierten Bakterienkolonien (Ward, E.S., Güssow, D.,
Griffiths, A.D., Jones, P.T. and Winter, G., "Binding
activities of a repertoire of single immunoglobulin variable
domains secreted from Escherichia coli", Nature (1989), 341,
25 544-546) oder durch Screenen von auf Nitrocellulose
übertragenen Plaques von Bakterienkolonien auf Reaktivität
gegen radioaktiv markierte Immunogene (Huse, W.D., Sastry,
L., Iverson, S.A., Kang, A.S., Alting-Mees, M., Burton,
D.R., Benkovic, S.J. and Lerner, R.A., "Generation of a
30 large combinatorial library of the immunoglobulin repertoire
in phage lambda," Science (1989), 246, 1275-1281)
selektiert. Zur Selektion jedoch von spezifischen
Antikörpern von Genbanken willkürlich kombinierter leichter
und schwerer Ketten von nicht-immunisierten Tieren, bei
35 denen kein Übergewicht von Antikörpern für ein bestimmtes

-2-

1

Antigen vorliegt, ist ein Verfahren zum Screenen von Millionen von Antikörper-produzierenden Bakterien notwendig.

5

Ein möglicher Weg, einen großen Bereich von Antikörpern zu screenen, liegt darin, rekombinante Antikörper an die Oberfläche von Bakterien oder Bakteriophagen zu binden, sodaß sie dann rasch durch an eine feste Phase gebundene Antigene selektiert werden können. Hinsichtlich der Schwierigkeiten, Proteine gezielt auf die Zelloberfläche von Bakterien zu bringen, ist die M13-Familie von filamentösen Bakteriophagen wegen ihrer kleinen Größe und ihres relativ einfachen genetischen Aufbaus ein verlockender Kandidat (vgl. Übersichtsartikel von Webster, R.E. and Lopez, J., in "Virus Structure and Assembly", herausgegeben von S. Casjens, veröffentlicht von Jones and Bartlett Inc., Bosten/Portala Valley, USA, 1985; Day, L.A., Marzec, C.J., Reisberg, S.A. and Casadevall, A., "DNA packaging in filamentous bacteriophages", Ann. Rev. Biophys. Chem. (1988), 17, 509-539).

10

15

20

25

30

35

Das Produkt von Gen III (pIII) ist ein relativ flexibles und zugängliches Molekül, das aus zwei funktionellen Domänen zusammengesetzt ist; einer amino-terminalen Domäne, die an den F-Pili männlicher Bakterien während der Infektion bindet, und einer carboxy-terminalen, innerhalb des Virion verborgenen Domäne, die für die Morphogenese wichtig ist. Peptide können zwischen den zwei Domänen von pIII (Smith, G.P., "Filamentous fusion phage: novel expression vectors that display cloned antigens on the virion surface", Science (1985), 228, 1315-1317) oder in der Nähe des N-Terminus (Parmley, S.F. and Smith, G.P., "Antibody-selectable filamentous fd phage vectors: affinity purification of target genes", Gene (1988), 73, 305-318) ohne Zerstörung seiner Funktionen in Morphogenese und Infektion inseriert

-3-

1

werden. Nach erheblicher Pionierarbeit über die Verwendung von pIII in fd Phagen zum Führen fremder Peptide, zeigten Parmely and Smith (1988, vorstehend angegeben), daß Peptidepitope, die am amino-terminalen Ende inseriert sind, Phagen an immobilisierte Antikörper binden können. In Folge dieser Arbeit war es möglich, Peptid-Genbanken zu entwickeln, die man auf Bindung an Liganden und Antikörpern screenen kann (Scott, J.K. and Smith, G.P. "Searching for peptide ligands with an epitope library", Science (1990), 249, 386-390; Devlin, J.J., Panganiban, L.C. and Devlin, P.E., "Random peptide libraries: A source of specific protein binding molecules", Science (1990), 249, 404-406; Cwirla, S.E., Peters, E.A., Barrett, R.W. and Dower, W.J., "Peptides on phage, a vast library of peptides for identifying ligands", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1990), 87, 6378-6382).

10

15

20

25

30

McCafferty, J., Griffith, A.D., Winter, G. and Chiswell, D.J., "Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains", Nature (1990), 348, 552-554 berichteten über den Zusammenbau eines Antikörper-pIII-Fusionsproteins in einen fd-Phagen mit einem Tet^R-Gen nach Insertion der Antikörper-DNA in das 5'-Ende von Gen III. Der Phage blieb infektiös und konnte durch Affinitäts-Chromatographie angereichert werden. Die Fusionsphagen zeigten sich jedoch hauptsächlich für relativ kleine Inserts als geeignet, wahrscheinlich weil die großen Inserts einen negativen Einfluß auf die Infektivität von pIII haben (Parmlee and Smith, 1988, vorstehend angegeben). Daher besteht ein großes Risiko, daß in Phagen-Genbanken nach ihrer Amplifikation schnell Deletionsmutanten dominieren.

35

Der vorliegenden Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, ein wirksameres Mittel zum Screenen von Antikörper-Genbanken

-4-

1

in Bakterien bereitzustellen.

5

Erfindungsgemäß wird dies durch ein Phagemid nach Anspruch 1 erreicht, das ein funktionelles Antikörper-pIII-Fusionsprotein exprimiert. Vorzugsweise ist der Antikörper ein Einzelketten-Antikörper.

10

15

20

25

DNA, die für ein Antikörper-pIII-Fusionsprotein, vorzugsweise ein Einzelketten-Antikörper-pIII-Fusionsprotein, codiert, wurde in ein Phagemid eingebaut. Ein großer Vorteil des erfindungsgemäßen Phagemid-Systems gegenüber McCafferty et al. (vorstehend angegeben) liegt darin, daß es als Plasmid vermehrt werden kann und nicht unter Selektionsdruck bezüglich der Entfernung von Antikörper-DNA steht, da die Expression des Fusionsproteins stark unterdrückt ist. Dies ist insbesondere während der Amplifikation der Antikörper-Genbanken wichtig, wenn schneller proliferierende Deletionsmutanten rasch dominant werden könnten. Die Phagemid DNA, die weniger als die Hälfte obiger Phagen DNA ausmacht, transformiert auch Bakterien effizienter. Darüberhinaus werden im Gegensatz zu obigem Phagensystem große Mengen der kleineren Phagemid DNA produziert und große Mengen von Antikörperprotein sind nach Induktion verfügbar, wodurch die Analyse stark erleichtert wird.

30

35

Die Expression des Antikörper-pIII-Fusionsproteins, insbesondere des Einzelketten-Antikörper-pIII-Fusionsproteins, unter Verwendung des pSEX-Phagemids und seiner Verpackung in virale Partikel erleichtert die Entwicklung bakterieller Systeme zur Isolierung von Antikörpern hoher Affinität. Millionen Antikörper-produzierende Klone von Antikörper-Genbanken kann man jetzt rasch durch Bindung an immobilisierte Antigene screenen. Ein weiterer Vorteil gegenüber herkömmlichen Verfahren zum Screenen liegt darin, daß nur kleine Mengen Antigen benötigt werden, ein

-5-

1 wichtiger Faktor, wenn der Vorrat eines seltenen Proteins
begrenzt ist. Dieses System ermöglicht auch, zufällig
mutierte Antikörper zu screenen, um ihre Bindungs-
Affinitäten zu erhöhen. Das Verfahren kann mehrfach
5 wiederholt werden, bis die gewünschte Spezifität erreicht
ist. Es ist nun zum ersten Mal möglich, in großem Maßstab
unterschiedliche Tests zum Screenen von verwandten Zellen
und Organismen durchzuführen. Eine subtraktive Selektion,
beispielsweise unter Verwendung von normalen und
10 neoplastischen Zellen, kann zur Identifizierung von
Tumor-assoziierten Antigenen verwendet werden. Das
Phagemid-System erweist sich auch als äußerst hilfreich für
die Untersuchung molekularer Wechselwirkungen,
beispielsweise durch Selektion von Antikörpern, die eine
15 Liganden-Rezeptor-Bindung verhindern.

Ebenso erweist sich das erfindungsgemäße System als nützlich,
andere Proteine oder Peptide an den Oberflächen von
Phagemid-Viruspartikeln zu präsentieren. Hierfür ist die
20 Antikörper-DNA nur durch die DNA des gewünschten Polypeptids
zu ersetzen.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung.

25 Beispiel 1

Konstruktion eines Phagemids (pSEX)

DNAs, die für einen Einzelketten-Antikörper (scAb) und pIII
30 codieren, wurden nach Insertion eines spezifischen Satzes
von Restriktionsstellen und einer Protease-sensitiven
Verbindungssequenz in die multiple Klonierungsstelle in pUC
119 kloniert. Die Ab-DNA codierte für die variablen Domänen
der schweren und leichten Kette eines humanisierten Ab gegen
35 Hühnereiweiß-Lysozym, der von dem Anti-Lysozym Ab D1.3
stammte (Amit et al., Science (1986), 233, 747-754;
Verhoeyen, M. et al., Science (1988), 239, 1534-1536). Diese
Domänen wurden über eine 18-Aminosäure-Linker-Sequenz

-6-

1 verbunden, die das Epitop des monoklonalen Ab YOL1/34
enthielt (Breitling, F. and Little, M., "Carboxy-terminal
regions on the surface of tubulin and microtubules: Epitope
locations of YOL1/34, DM1A and DM1B", J. Mol. Biol. (1986),
5 189, 367-370), wodurch der Ab identifiziert werden konnte.
Zur Bereitstellung einer flexibleren Verbindung zu pIII,
wurde das 3'-Ende der DNA für die leichte Kette durch Zusatz
von Nucleotiden, die für die ersten sechs Aminosäuren der
konstanten Domäne in der menschlichen Kappa-Kette codierten,
10 gefolgt von einer BamHI-Restrictionsstelle modifiziert. pIII
DNA wurde von dem Bakteriophagen M13 amplifiziert, indem
Primer entsprechend der 5'- und 3'-Enden des Gens III
verwendet wurden. Die Ab-pIII-DNA wurde dann in einem
Phagemid der pDS-Familie kloniert, das einen mit zwei
15 lac-Operatoren kombinierten Coliphagen-T7-Promotor enthielt
(Bujard, H., Gentz, R., Lancer, M., Stüber, D., Müller,
H.-M., Ibrahim, I., Häuptle, M.-T. and Dobberstein, B.,
"A T5 promoter-based transcription-translation system for
the analysis of proteins in vitro and in vivo", Methods
20 Enzymol. (1987), 155, 416-433; Lancer, M. and Bujard, H.,
"Promoters determine the efficiency of repressor action",
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1988), 85, 8973-8977; Müller,
H.-M., Ph. D. thesis, Univ. Heidelberg, 1989). Schließlich
wurde eine für die Leader-Sequenz des bakteriellen Enzyms
25 Pektatlyase codierende DNA an das 5'-Ende der Ab-DNA
ligiert, wodurch das Phagemid pSEX (Fig. 1a) erhalten wurde.
Die Leader-, Linker- und PCR-Primer-Sequenzen sind in Figur
1b gezeigt. Eine alternative Linker-Sequenz (Fig. 1c) mit
dem YOL1/34 Epitop am Ende des Linkers, die eine nützliche
30 Restriktionsstelle zur Insertion von Ab-Genbanken enthielt,
wurde auch verwendet. Obwohl beide tag-Linker eine
bedeutsame Menge saurer Reste enthielten, zeigten sie sich
ohne Effekt auf die Herstellung von funktionellen scAbs im
Vergleich mit scAbs, deren Linker nur aus den neutralen
35 Aminosäuren Glycin und Serin zusammengesetzt waren.

-7-

1

Beispiel 2

5

Expression eines Antikörper-pIII-Fusionsproteins

10

15

20

25

30

Zur Überprüfung, ob der fertige Phagemid-Vektor in der Lage war, das Fusionsprotein in voller Länge zu exprimieren, wurden 100 μ m IPTG einer sich in log-Phase befindlichen, mit pSEX transformierten E. coli-Kultur zugegeben. Die Kultur zeigte einen deutlichen Rückgang in ihrer Wachstumsrate, verglichen mit der Kontrolle, was auf eine bedeutsame Synthese eines Phagemid-codierten Proteins hinwies. In der Western-Blot-Analyse wurde das Antikörper-pIII-Konstrukt durch drei Antikörper identifiziert; einem monoklonalen Antikörper gegen einen Teil der Linker-Sequenz (EEGEFSEAR) und zwei Anti-Peptid-Kaninchenseren gegen N-terminale Sequenzen der schweren und leichten Ketten (QVQLQQSGGG bzw. DJQMTQSPSS). Es wanderte mit einem offensichtlichen Molekulargewicht von 93 kD (Fig. 2). Die große Größe des Fusionsproteins (vorausgesetzt: Mr 68.100) ist höchstwahrscheinlich durch die pIII-Komponente (Mr 42.100) bedingt, die mit einem offensichtlichen Molekulargewicht von etwa 55.000 - 70.000 kD wandert (Goldsmith, M.E. and Königsberg, W.H., "Adsorption protein of the bacteriophage fd: isolation, molecular properties and location in the virus", Biochemistry (1977), 16, 2868-2694). Partielle Proteolyse des Fusionsprotein wurde durch das Vorliegen einiger schwächerer Banden niedrigeren Molekulargewichts angezeigt, die mit den drei Antikörpern identisch angefärbt wurden.

35

Eine Zellfraktionierung zeigte, daß das Protein in den Cytoplasma und Membran-Fraktionen vorlag, nicht aber im Periplasma und dem Kulturüberstand (Fig. 2, Spuren 3-6) im Gegensatz zu der Antikörper-Komponente allein ohne pIII, die in das

-8-

1 Periplasma und das Medium sekretiert wurde (Daten nicht
gezeigt). Dies war nicht überraschend, da pIII auf
Phagenpartikeln aus der inneren bakteriellen Membran
5 zusammengesetzt wird, ein Prozeß, der scheinbar nur von der
C-terminalen Domäne abhängt. Deletionsmutanten von pIII ohne
diese Domäne gelangen in das Periplasma, ohne an die
cytoplasmatische Membran gebunden zu werden (Boeke, J.D. and
Model, P., "A prokaryotic membrane anchor sequence: carboxyl
10 terminus of bacteriophage fl gene III protein retained in
the membrane", Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1982), 79,
5200-5204), und normale Phagenpartikel werden nicht
zusammengesetzt (Crissman, J.W. and Smith, G.P., "Gene III
protein of filamentous phages: evidence for a
15 carboxy-terminal domain with a role in morphogenesis",
Virology (1984), 132, 445-455). Die Anker-Sequenz ist
wahrscheinlich eine hydrophobe Strecke von 23 Aminosäuren am
Carboxy-Terminus (Davis, N.G., Boeke, S. and Model, P.,
"Fine structure of a membrane anchor domain", J. Mol. Biol.
20 (1985), 181, 111-121).

Die Fähigkeit des Fusionsproteins, ein Antigen zu binden,
wurde untersucht, indem die Triton-lösliche Fraktion über
eine an Sepharose gebundene Lysozymsäule gegeben wurde.
25 Western Blots des ungebundenen Materials und der nach
gründlichem Waschen und Eluieren mit 0,05 M Dimethylamin
erhaltenen Fraktionen zeigten, daß das Fusionsprotein in
voller Länge tatsächlich spezifisch auf der Lysozymsäule
zurückgehalten wurde (Fig. 2, Spuren 7-12).

Beispiel 3

Verpackung des pSEX-Phagemids

35 Zur Bestimmung, ob der Phagemid-Expressionsvektor verpackt
werden konnte, wurden pSEX-enthaltende E.coli mehrfach mit

1 dem Phagen fd infiziert. IPTG wurde nicht zugabe, da
gefunden wurde, daß es einen inhibitorischen Effekt auf das
Verpacken eines Phagemids hat. Ähnliches wurde kürzlich von
5 Bass et al., Proteins (1990), 8, 309-314 berichtet, der ein
Phagemid konstruierte, das ein Fusionsprotein aus humanem
Wachstumshormon und der C-terminalen Domäne von pIII
exprimierte. Die Untersuchung der Ab-pIII-Produktion mit und
ohne IPTG nach Zugabe des Phagen fd zeigte, daß der Phage
10 allein in der Lage war, eine Expression zu induzieren (Fig
3). Eine mögliche Erklärung hierfür ist, daß eines der
Phagen-Gen-Produkte die Bindung des lac-Repressors an den
Operator stört. Andererseits könnte die Bindung von
Phagen-Proteinen an die Zwischengenregion die Topologie d s
15 Phagemid beeinflussen und die Freisetzung des lac-Repressors
bewirken. Wie auch immer, wir haben gefunden, daß das
Durchwandern der Zwischengenregion 10^3 Nukleotide zu der
anderen Seite des bla-Gens keinen Effekt auf dieses Phänomen
hat (Daten nicht gezeigt).

20 Agarose-Gelelektrophorese der von Viruspartikeln in das
Medium abgegebenen DNA zeigt zusätzlich zu der Einzelstrang-
DNA von fd eine größere Menge kleinerer DNA, die in der
Größe mit einzelsträngigem pSEX vergleichbar war. Ein
25 weiterer Beweis für eine Phagemid-Verpackung und der
Produktion von infektiösen Partikeln wurde durch Infektion
von E.coli mit den abgegebenen Virus-Partikeln erbracht.
 10^{10} ml Amp^R E.coli Kolonien wurden im Vergleich zu
 3×10^9 pfu erhalten.

30 Zur Bestimmung, ob das verpackte Phagemid das
Antikörper-pIII-Fusionsprotein eingebaut hatte, wurden 90
µl Kulturüberstand, der 5×10^8 verpackte, als Amp^R
transduzierende Einheiten bestimmte Phagemide enthielt, mit
35 einem tausend-fachen Überschuß an Wildtyp fd-Phage gemischt,

-10-

1 und über eine Säule immobilisierten Lysozyms gegeben. Nach
gründlichem Waschen mit 10-fachem Badvolumen von PBS, 1 M
NaCl bzw. 0,5 M NaCl in 0,1 M NaHCO₃ bei pH 8,3 wurden die
5 Phagemid-Partikel mit 0,05 M Diethylamin eluiert. Das Eluat
wurde mit 0,5 M NaH₂PO₄ neutralisiert und auf die Anzahl
der Phagen und verpackten Phagemide getestet (Tabelle). Eine
spezifische Anreicherung von bis zu 121-fach wurde erreicht,
was den Einbau von funktionellen Antikörper-pIII-Konstrukten
10 in die Phagemid-Partikel zeigte. Die Bindungseigenschaften
der Phagemid-Partikel können weiter erhöht werden, indem
eine pIII Deletionsmutante zum Verpacken verwendet wird.
Dies garantiert, daß nur jene Phagemide, die für
funktionelle Fusionsproteine codieren, verpackt werden und
15 alle fünf pIII-Proteine auf einem Phagemid-Partikel mit
Antikörper fusioniert werden.

Beschreibung der Figuren

20 Figur 1: Konstruktion von pSEX, einem
Phagemid zum Screenen von Antikörpern

VH und VL sind variable Domänen der schweren bzw. leichten
Kette eines Anti-Lysozym-Ab.

25 (a) Konstruktion

Zur Bereitstellung der notwendigen Restriktionsstellen,
wurden die Oligonukleotide

5'GCTGAATTCGGATCCATAGGGCCCTCTAGAGTCGAC3' und

30 5'AATTGTCGACTCTAGAGGGCCCTATGGATCCGAATTCAGCTGCA3'

5'-phosphoryliert, miteinander hybridisiert und in pUC119
ligiert, der mit PstI und EcoRI geschnitten und
dephosphoryliert war. Gegebenenfalls wurden zur

-11-

1

Schaffung einer Protease-sensitiven Sequenz di
hybridisierten Oligonucleotide 5'GATCCAAAGATATCAGAGGGCC3'
und 5'CTCTGATATCTTTG3' zwischen die BamHI- und ApaI-Stellen
des ersten Oligonucleotid-Satzes inseriert. scAB-DNA wurde
dann zwischen die PstI- und BamHI-Stellen inseriert, gefolgt
von der Ligierung der pIII-DNA über stumpfe Enden nach
Spaltung des Phagemids mit ApaI und Behandlung mit
T4-DNA-Polymerase zur Entfernung 3'-überhängender Enden.
pSEX wurde hergestellt, indem die multiple Klonierungsstelle
von pUHE 24-2 mit dem nahe verwandten Phagemid pDS31-1
kombiniert wurde, das eine zusätzliche fl Zwischengenregion
enthielt (Bujard et al., 1987, vorstehend angegeben; Müller,
1989, vorstehend angegeben). die pDS31-1-Sequenz erstreckt
sich von XhoI entgegen des Uhrzeigersinns bis zu einer
HindIII-Stelle (in Klammern), die nach Ligierung über
stumpfe Enden verloren wurde. pUHE24-2 ist im wesentlichen
mit pDSG identisch (Bujard et al., 1987), bei dem ein
Choli-Phage T7-Promotor mit zwei lac-Operatoren und einer
Ribosomen-Bindungsstelle kombiniert ist (PA1/04/03, Lancer
and Bujard, 1988, vorstehend angegeben; Lanzer, 1988,
vorstehend angegeben). Das erhaltene Phagemid wurde mit
HindIII geschnitten und die 5'-überhängenden Enden wurden
mit Klenow-Fragment aufgefüllt. Nach einer weiteren Spaltung
mit PstI, wurde das PstI-HincII Ab-pIII-DNA-Fragment in das
Phagemid inseriert. Schließlich wurde eine synthetische DNA,
die für die Leader-Sequenz des Bakterienenzym Pektatlyase
und für die ersten vier Aminosäuren der schweren Kette
codiert, zwischen die NcoI und PstI-Restriktionsstellen
inseriert. pUHE-Plasmide wurden in E.coli 71-18 mit dem
Plasmid pDM1, das den lac-Repressor exprimiert, vermehrt,
pUC-Plasmide wurden in DH5 vermehrt und das
Antikörper-pIII-Fusionsprotein in JM101 exprimiert.

35

-12-

1

(b) Sequenz der Ribosomenbindungsstelle (RBS), der Leader-Sequenz der Pektatlyase, des tag-Linkers und der PCR-Primer für pIII.

5

Unterstrichene Aminosäuren geben das Epitop für YOL1/34 an. Die folgenden Aminosäuren in der Linker-Sequenz sind eine Fortführung der -Tubulin-Sequenz.

(c) Mögliche tag-Linker-Sequenz.

10

Unterstrichene Aminosäuren geben das Epitop für YOL11/34 an. Die Aminosäuren des vorhergehenden Linkers sind eine Fortführung der Ab-Sequenz in die konstante Domäne.

15

Fig. 2: Induzierbarkeit, zelluläre Lokalisierung und Antigenbindung des Antikörper-pIII-Fusionsproteins, analysiert durch Gelelektrophorese auf 8 % Polyacrylamidgelen und Western Blott.

20

Spuren 1 und 2: Gesamte Zellen nach 1 h Inkubation mit 100 μ M IPTG (1) oder ohne IPTG (2).

Spuren 3 - 6: Zellfraktionierung; 3: Kulturüberstand, 4: periplasmatisch angereicherte Fraktion, 5: lösliche cytoplasmatische Fraktionierung, 6: 1 % Tritonextrakt.

25

Spuren 7 - 12: Lysozym-Affinitätschromatographie des 1 % Tritonextraktes von induzierten und nicht-induzierten Zellen, 7: Ausfluß (+IPTG), 8: Ausfluß (-IPTG), 9: letzte Waschung (+IPTG), 10: letzte Waschung (-IPTG), 11: Eluat (+IPTG), 12: Eluat (-IPTG).

30

Spuren 1 - 6 wurden angefärbt unter Verwendung des monoklonalen Antikörpers YOL1/34 (Serotec, Oxford, U.K.) und Spuren 7 - 12 unter Verwendung eines Antiserums gegen die N-terminale Sequenz der leichten Kette.

35

-13-

1

Durchführung:

Antiseren gegen die schweren und leichten Ketten wurden durch subkutane Injektion von Kaninchen mit den

5 amino-terminalen Peptiden QVQLQSSGGG(AC) bzw. DIQMTQSPSS(AC) erhalten, die an das Heamocyanin der Schlüsselloch-Napfschnecke gekoppelt waren. Zur Untersuchung der

Expression des Fusionsproteins wurden pelletierte Bakterien von IPTG-induzierten Kulturen in 30 mM Tris/HCl, pH 8,0

10 Puffer resuspendiert, der 20 % Sucrose, 1 mM EDTA, 1 mg/ml Hühnerlysozym enthielt, und 10 min auf Eis inkubiert. Nach 1

minütiger Zentrifugation bei 15 000 g wurde der die periplasmatischen Proteine enthaltende Überstand gesammelt und das Pellet in 0,1 M Tris/HCl, pH 8,0 beschallt. Die

15 lösliche cytosolische Fraktion wurde nach 5 minütiger Zentrifugation bei 15 000 g abdekantiert und das

resuspendierte Pellet in 1 % Triton X100 inkubiert, wodurch die membrangebundene Fraktion erhalten wurde. Sämtliche

Fraktionen wurden auf β -Lactamase-Aktivität gemäß Plückthun, A. und Knowles, J.R.: "The consequences of stepwise

20 deletions from the signal-processing site for β -lactamase", J.Biol. Chem. 262 (1987), 3951-3957 getestet, um die Effizienz des Fraktionierungsschrittes zu erfahren. Die

tritonlösliche Fraktion wurde mit PBS 100-fach verdünnt, bevor sie Affinitätssäulen zugegeben wurde. Zur

25 Affinitäts-Chromatographie wurde Hühnerlysozym (Boehringer, Mannheim, FRG) mit Cyanogenbromid-aktivierter Sepharose (Pharmacia) gemäß den Anweisungen des Herstellers gekoppelt.

Die Lysozym-Sepharose wurde 20 min bei Raumtemperatur mit den Extrakten inkubiert und in Säulen gegossen, die

30 nachfolgend mit 10 Bad-Volumina von PBS, 1M NaCl bzw. 0,5 M NaCl in 0,1 M NaHCO_3 bei pH 8,3 gewaschen wurden, bevor sie mit 0,05 M Diethylamin eluiert wurden. Sämtliche

Fraktionen wurden mit Trichloressigsäure (Endkonzentration

35 20 %) präzipitiert und in SDS Polyacrylamidgelen aufgetrennt (Laemmli, U.K.: "Cleavage of structural proteins

-14-

1 during the assembly of the head of the bacteriophage T4",
Nature (1970), 227, 680-685). Western Blots wurden gemäß
Towbin, H Steahelin, T. and Gordon, I.: "Electrophoretic
5 transfer of protein from polyacrylamide gels to
nitrocellulose sheets: procedures and some applications",
Proc. Natl. Acad. Sci. USA (1979), 76, 4350-4354,
durchgeführt, indem zweite Antikörper, die an
Meerrettich-Peroxidase gekoppelt waren, mit Diaminobenziden
10 als Substrat verwendet wurden.

Fig. 3: Gelelektrophorese von zirkulärem einzelsträngigen
pSEX

15 Spur 1: fd, Spur 2: Kontroll-Phagemid pUHE31-1 mit fd,
Spur 3: pSEX1 mit fd.

DNA von fd Virionen und verpackte Phagemid-Partikel wurden
20 auf 0,8 % Agarosegele in 1xTBE gemäß Sambrook, J., Fritsch,
E.F. und Maniatis, T. in "Molecular Cloning: A Laboratory
Manual, "2. Auflage, herausgegeben in Cold Spring Harbor
Laboratory (1989) gegeben und mit Ethidiumbromid angefärbt.

25 Durchführung:

Zur Herstellung verpackter Phagemide wurden pSEX1
enthaltende E. coli JM101 auf M9 Minimalmedium ausplattiert
und 30 h bei 37°C inkubiert. 2 ml des gleichen Mediums
30 wurden mit einer der Kolonien angeimpft und bei 37°C unter
kräftiger Belüftung inkubiert, bis eine optische Dichte von
etwa 0,2 bei 600 nm erreicht wurde. 0,5 ml LB-Medium und ein
10-facher Überschuß des Phagen fd wurden dann der Kultur
zugegeben und diese weitere 3 h bei 37°C inkubiert. Nachdem
35 zweimal vorsichtig bei 15 000 g 5 min lang bei Raumtemperatur

-15-

1

zentrifugiert worden war, wurde der Überstand auf eine
Endkonzentration von 4 % Polyethylenglykol (Serva PEG 6000)
und 0,5 M NaCL eingestellt und über Nacht bei 4°C stehen
5 gelassen. Die Phagemide wurden durch 20 minütige
Zentrifugation bei Raumtemperatur und 15 000 g sedimentiert
und in 200 µl Tris-EDTA-Puffer, pH 7,5 suspendiert.
Phagemid DNA wurde durch zehnminütiges Schütteln mit einem
Volumen Phenol, gefolgt von einer Behandlung mit
10 Chloroform-Isopropanol und Präzipitation mit Isopropanol
präpariert (Sambrook, J., Fritsch, E.F. and Maniatis, T., in
"Molecular Cloning: A Laboratory Manual", 2. Auflage,
herausgegeben in Cold Spring Harbor Laboratory (1989)).

15

20

25

30

35

TABELLE

Spezifische Anreicherung von verpackten Phagemiden an einer Antigen-Affinitätssäule

	Gesamtes Volumen (ml)	Plattiertes Volumen (ul)	Amp ^r Kolonien		Gesamt Volumen (ul)	Gesamt pfu Zahl	Gesamt 10^6	Überschuß pfu/Amp	Anreiche- rungs- faktor
			Zahl	Zahl					
Aufgetragen	10	10^{-3}	51	51	$5,1 \times 10^8$	45	$4,5 \times 10^{11}$	882	--
Eluliert	1,1	10^{-1}	26	26	$2,9 \times 10^5$	19	$2,1 \times 10^6$	7,3	$\frac{1}{16}$

- 17 -

5

Patentansprüche

1. Phagemid mit einer für ein Fusionsprotein aus einem Antikörper und einem Coliphagen pIII-Protein codierenden DNA, dadurch gekennzeichnet, daß das Fusionsprotein das Coliphagen pIII-Protein in voller Länge umfaßt.
2. Phagemid nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß der Antikörper ein Einzelketten-Antikörper ist.
3. Phagemid nach Anspruch 1 oder 2, dadurch gekennzeichnet, daß das Fusionsprotein zwischen dem Antikörper und dem Coliphagen pIII-Protein einen Protease-sensitiven Bereich enthält.
4. Phagemid nach einem der Ansprüche 1 - 3, dadurch gekennzeichnet, daß es die Struktur von Fig. 1 hat.
5. Verfahren zur Herstellung eines Phagemids nach Anspruch 1, bei dem eine für einen Antikörper codierende DNA mit einer für ein Coliphagen pIII-Protein in voller Länge codierende DNA fusioniert und das erhaltene DNA Molekül in ein übliches Phagemid inseriert werden, wobei hierfür übliche DNA Rekombinationstechniken angewandt werden.
6. Verfahren nach Anspruch 5, dadurch gekennzeichnet, daß eine für einen Einzelketten-Antikörper codierende DNA verwendet wird.
7. Verfahren nach Anspruch 5 oder 6, dadurch gekennzeichnet, daß zwischen den für den Antikörper und das Coliphagen pIII-Protein codierenden DNA Sequenzen eine Protease-sensitive Sequenz eingefügt wird.

- 18 -

1

8. Verwendung des Phagemids nach einem der Ansprüche 1 - 4 zur Selektion auf spezifische Antikörper aus Antikörper-Genbanken.

5

9. Verwendung des Phagemids nach einem der Ansprüche 1 - 4 zur Präsentation anderer Proteine oder Peptide auf der Oberfläche von Phagemid-Partikeln durch Austausch der den Antikörper codierenden DNA durch jene des gewünschten Proteins bzw. Peptids.

10

15

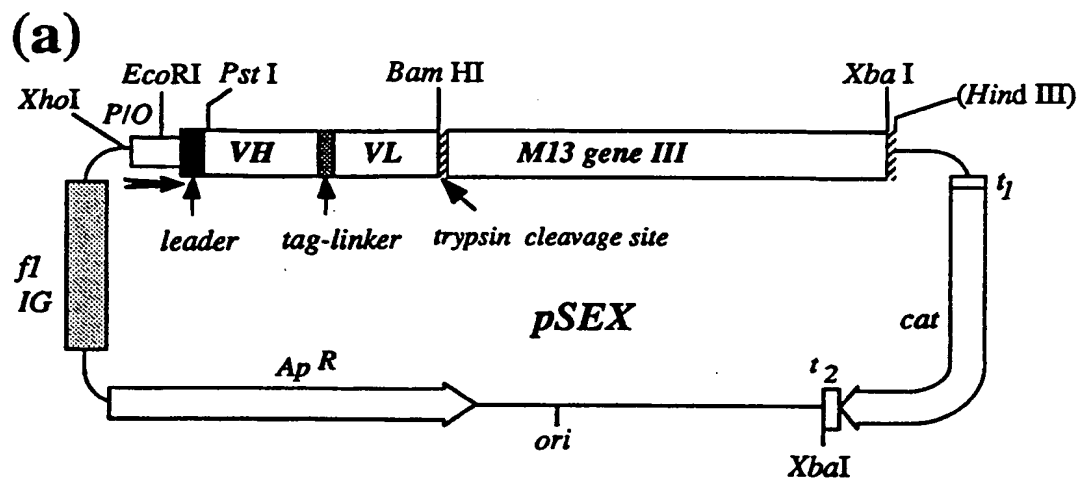
20

25

30

35

1/3



(b)

RBS \rightarrow **pelB leader**

86 GAATTCATTAAAGAGGAGAAATTACTCCATGAAATACCTCTTGCTACGGCAGCCGCTGGCTTG
EcoRI (NcoI)

151 \rightarrow **VH** 523 \rightarrow **tag-linker**

LeuLeuLeuAlaAlaGlnProAlaMetAlaGlnValGlnLeuGln...SerSerGluGluGly
CTGCTGCTGGCAGCTCAGCGGGGATGGCGCAAGTTCAGCTGCAG...TCCTCAGAAGAAGGT
PstI

538 \rightarrow **VL** 895

GluPheSerGluAlaArgGluAspMetAlaAlaLeuGluLysGlyAspIle...LysArgThr
GAATTCTCAGAAGCTCGTGAAGATATGGCTGCACCTTGAGAAAGGTGATATC...AAACGTACG
EcoRI EcoRV

904 \rightarrow **M13 gene III**

ValAlaAlaProGlySerLysAspIleArgAlaGluThrValGluSerCys...
GTAGCAGCTCCTGGATCCAAAGATATCAGAGCTGAAACTGTTGAAAGTTGT...
BamHI EcoRV forward primer

2137

...ArgAsnLysGluSer...
...CGTAATAAGGAGTCTTAATGACTCTAGAGTCAGCTT
TTATTCCTCAGAATTACT XbaI (HindIII)
backward primer

(c)

526 \rightarrow **tag-linker** \rightarrow **VL**

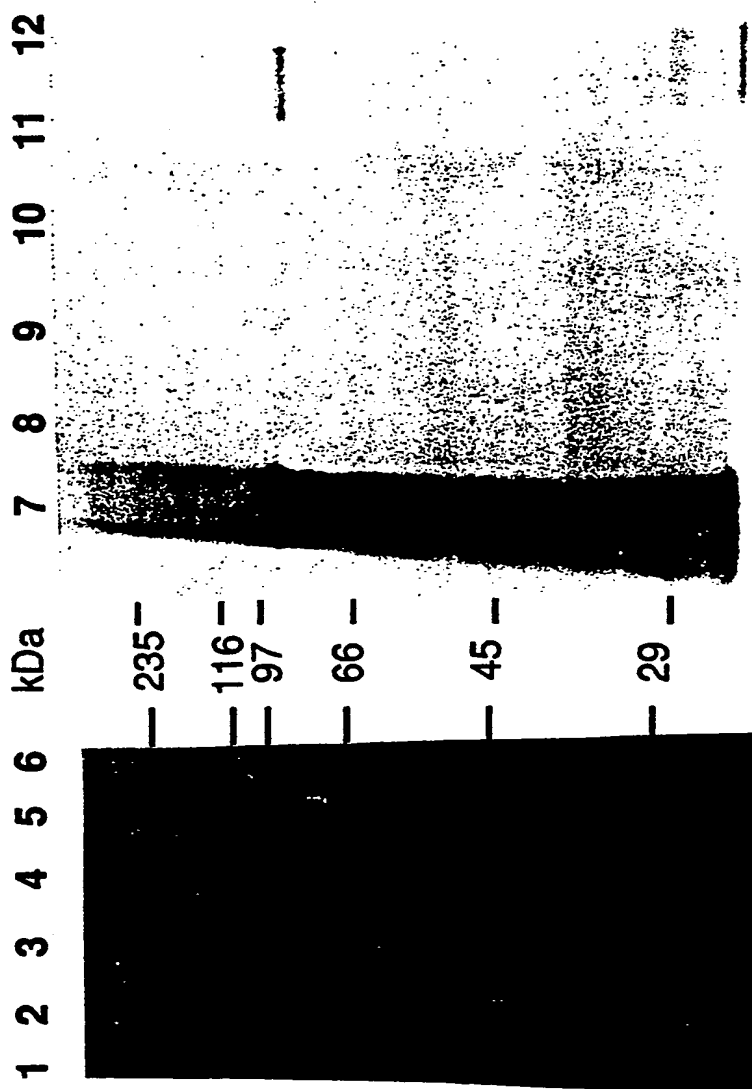
SerGlySerAlaSerAlaProLysLeuGluGluGlyGluPheSerGluAlaArgGluAspIle
TCAGGGAGTGCATCGCCCCAAGCTTGAAGAAGGTGAATTCCTCAGAAGCGCGCAAGATATC
HindIII EcoRI BssHII EcoRV

Fig.1

ERSATZBLATT

2/3

Fig. 2



ERSATZBLATT

3/3

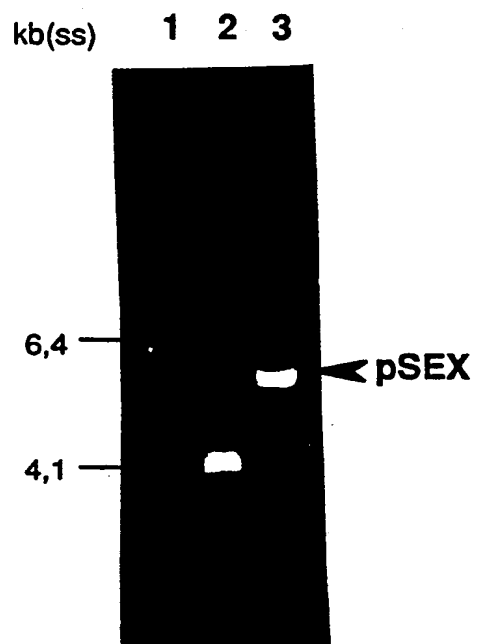


Fig. 3

ERSATZBLATT

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 92/01524

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int. Cl. 5: C12N 15/13; C12P 21/08; C12Q 1/68; C07K 15/28; G01N 33/53

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int. Cl. 5: C12N; C07K; G01N; C12P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	NATURE Vol. 348, 6 December 1990, MACMILLAN JOURNALS LTD., LONDON, UK; pages 552 - 554 J. MCCAFFERTY ET AL. 'Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains' (cited in the application)	1,2,5,6, 8,9
Y	see page 552, right column, line 1 - page 554, right column, line 30; figure 1 ----- -/--	1,3,5,7



Further documents are listed in the continuation of Box C.



See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

24 SEPTEMBER 1992 (24.09.92)

Date of mailing of the international search report

12 OCTOBER 1992 (12.10.92)

Name and mailing address of the ISA/

EUROPEAN PATENT OFFICE

Facsimile No.

Authorized officer

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/EP 92/01524

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

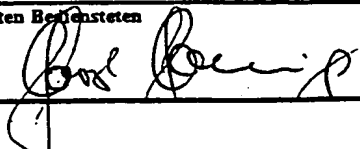
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	<p>NATURE Vol. 341, 12 October 1989, MACMILLAN JOURNALS LTD., LONDON, UK; pages 544 - 546 E.S. WARD ET AL. 'Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from Escherichia coli' (cited in the application) see page 545, left column, line 23 - line 24; figure 2</p>	1,3,5,7
X	<p>PROC. NATL. ACAD SCI. Vol. 87, 1990, NATL. ACAD SCI., WASHINGTON, DC, US; pages 6378 - 6382 S.E. CWIRLA ET AL. 'Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands' (cited in the application) see page 6378, right column, line 1 - page 6380, right column, line 13; figure 1</p>	1,9
X	<p>SCIENCE Vol. 249, 27 July 1990, AAAS, WASHINGTON, DC, US; pages 386 - 390 J.K. SCOTT AND G.P. SMITH 'Searching for peptide ligands with an epitope library' (cited in the application) see page 389, right column, line 3 - line 33; figure 1</p>	1,9
P,X	<p>GENE Vol. 104, No. 2, 15 August 1991, ELSEVIER PUBLISHERS, N.Y., US; pages 147 - 153 F. BREITLING ET AL. 'A surface expression vector for antibody screening' see page 149, right column, line 8 - page 152, left column, line 13; figures 1-4</p>	1,9
P,X	<p>WO, A, 9 209 690 (GENENTECH, INC.) 11 June 1992 see claims 1-52; figure 1</p>	1,9

EP 9201524
SA 61471

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
W0-A-9209690	11-06-92	None	

EPO FORM PC479

BNSDOCID: <WO 9301288A1>

I. KLASSIFIKATION DES ANMELDUNGSGEGENSTANDS (bei mehreren Klassifikationssymbolen sind alle anzugeben) ⁶		
Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPC) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPC		
Int.Kl. 5 C12N15/13; C12P21/08; C12Q1/68; C07K15/28 G01N33/53		
II. RECHERCHIERTE SACHGEBIETE		
Recherchierter Mindestprüfstoff ⁷		
Klassifikationssystem	Klassifikationssymbole	
Int.Kl. 5	C12N ; C07K ; G01N ; C12P	
Recherchierte nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Sachgebiete fallen ⁸		
III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN ⁹		
Art. ⁹	Kennzeichnung der Veröffentlichung ¹¹ , soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile ¹²	Betr. Anspruch Nr. ¹³
X	NATURE Bd. 348, 6. Dezember 1990, MACMILLAN JOURNALS LTD., LONDON, UK; Seiten 552 - 554 J. MCCAFFERTY ET AL. 'Phage antibodies: filamentous phage displaying antibody variable domains' in der Anmeldung erwähnt	1,2,5,6, 8,9
Y	siehe Seite 552, rechte Spalte, Zeile 1 - Seite 554, rechte Spalte, Zeile 30; Abbildung 1 --- -/-	1,3,5,7
<p>⁹ Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen¹⁰ :</p> <p>"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist</p> <p>"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)</p> <p>"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht</p> <p>"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist</p> <p>"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist</p> <p>"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden</p> <p>"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist</p> <p>"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist</p>		
IV. BESCHEINIGUNG		
Datum des Abschlusses der internationalen Recherche 24. SEPTEMBER 1992		Absenddatum des internationalen Recherchenberichts 12. 10. 92
Internationale Recherchenbehörde EUROPAISCHES PATENTAMT		Unterschrift des bevollmächtigten Beauftragten HORNIG H. 

III. EINSCHLAGIGE VERÖFFENTLICHUNGEN (Fortsetzung von Blatt 2)		
Art °	Kennzeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der maßgeblichen Teile	Betr. Anspruch Nr.
Y	<p>NATURE Bd. 341, 12. Oktober 1989, MACMILLAN JOURNALS LTD., LONDON, UK; Seiten 544 - 546 E.S. WARD ET AL. 'Binding activities of a repertoire of single immunoglobulin variable domains secreted from Escherichia coli' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 545, linke Spalte, Zeile 23 - Zeile 24; Abbildung 2 ---</p>	1,3,5,7
X	<p>PROC. NATL. ACAD SCI. Bd. 87, 1990, NATL. ACAD SCI., WASHINGTON, DC, US; Seiten 6378 - 6382 S.E. CWIRLA ET AL. 'Peptides on phage: a vast library of peptides for identifying ligands' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 6378, rechte Spalte, Zeile 1 - Seite 6380, rechte Spalte, Zeile 13; Abbildung 1 ---</p>	1,9
X	<p>SCIENCE, Bd. 249, 27. Juli 1990, AAAS, WASHINGTON, DC, US; Seiten 386 - 390 J.K. SCOTT AND G.P. SMITH 'Searching for peptide ligands with an epitope library' in der Anmeldung erwähnt siehe Seite 389, rechte Spalte, Zeile 3 - Zeile 33; Abbildung 1 ---</p>	1,9
P,X	<p>GENE Bd. 104, Nr. 2, 15. August 1991, ELSEVIER PUBLISHERS, N.Y., U.S.; Seiten 147 - 153 F. BREITLING ET AL. 'A surface expression vector for antibody screening' siehe Seite 149, rechte Spalte, Zeile 8 - Seite 152, linke Spalte, Zeile 13; Abbildungen 1-4 ---</p>	1-9
P,X	<p>WO,A,9 209 690 (GENENTECH, INC.) 11. Juni 1992 siehe Ansprüche 1-52; Abbildung 1 -----</p>	1,9

EP 9201524
SA 61471

24/09/92

EPO FORM P0473

BNSDOCID: <WO 9301288A1>

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Translation

PATENT COOPERATION TREATY

PCT

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

5000

(PCT Article 36 and Rule 70)

09/555350

Applicant's or agent's file reference 158-2 PCT	FOR FURTHER ACTION See Notification of Transmittal of International Preliminary Examination Report (Form PCT/IPEA/416)	
International application No. PCT/DE98/03543	International filing date (day/month/year) 27 November 1998 (27.11.98)	Priority date (day/month/year) 28 November 1997 (28.11.97)
International Patent Classification (IPC) or national classification and IPC C12N 15/86		
Applicant BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND letztvertreten durch DEN PRÄSIDENTEN DES PAUL-EHRLICH INSTITUTS PROF. DR. R. KURTH		

1. This international preliminary examination report has been prepared by this International Preliminary Examining Authority and is transmitted to the applicant according to Article 36.
2. This REPORT consists of a total of <u>5</u> sheets, including this cover sheet. <input type="checkbox"/> This report is also accompanied by ANNEXES, i.e., sheets of the description, claims and/or drawings which have been amended and are the basis for this report and/or sheets containing rectifications made before this Authority (see Rule 70.16 and Section 607 of the Administrative Instructions under the PCT). These annexes consist of a total of _____ sheets.
3. This report contains indications relating to the following items: I <input checked="" type="checkbox"/> Basis of the report II <input type="checkbox"/> Priority III <input type="checkbox"/> Non-establishment of opinion with regard to novelty, inventive step and industrial applicability IV <input type="checkbox"/> Lack of unity of invention V <input checked="" type="checkbox"/> Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement VI <input type="checkbox"/> Certain documents cited VII <input type="checkbox"/> Certain defects in the international application VIII <input type="checkbox"/> Certain observations on the international application

Date of submission of the demand 18 June 1999 (18.06.99)	Date of completion of this report 03 February 2000 (03.02.2000)
Name and mailing address of the IPEA/EP	Authorized officer
Facsimile No.	Telephone No.

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL PRELIMINARY EXAMINATION REPORT

International application No.

PCT/DE98/03543

I. Basis of the report

1. This report has been drawn on the basis of *(Replacement sheets which have been furnished to the receiving Office in response to an invitation under Article 14 are referred to in this report as "originally filed" and are not annexed to the report since they do not contain amendments.)*:

- ☐ the international application as originally filed.
- ☒ the description. pages 1-28,28a, as originally filed,
 pages _____, filed with the demand,
 pages _____, filed with the letter of _____,
 pages _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the claims. Nos. 1-18, as originally filed,
 Nos. _____, as amended under Article 19,
 Nos. _____, filed with the demand,
 Nos. _____, filed with the letter of _____,
 Nos. _____, filed with the letter of _____.
- ☒ the drawings. sheets/fig 1/5-5/5, as originally filed,
 sheets/fig _____, filed with the demand,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____,
 sheets/fig _____, filed with the letter of _____.

2. The amendments have resulted in the cancellation of:

- ☐ the description. pages _____
- ☐ the claims. Nos. _____
- ☐ the drawings. sheets/fig _____

3. ☐ This report has been established as if (some of) the amendments had not been made, since they have been considered to go beyond the disclosure as filed, as indicated in the Supplemental Box (Rule 70.2(c)).

4. Additional observations, if necessary:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

V. Reasoned statement under Article 35(2) with regard to novelty, inventive step or industrial applicability; citations and explanations supporting such statement**1. Statement**

Novelty (N)	Claims	1-9, 13, 17	YES
	Claims	10-12, 14-16, 18	NO
Inventive step (IS)	Claims	1-9	YES
	Claims	10-18	NO
Industrial applicability (IA)	Claims	1-18	YES
	Claims		NO

2. Citations and explanations

1. The present application concerns a method for producing cell-specific retroviral vectors with antibody recognition domains (scFv), the vectors obtained by means of said method, the use thereof, and packing cells for extracting said vectors.
2. Reference is made to the following documents:

D1: WO-A-95/23846 (UNIV. MEDICINE & DENTISTRY OF N), September 8, 1995

D2: CHU T. H. ET AL.: 'Toward highly efficient cell-type-specific gene transfer with retroviral vectors displaying single-chain antibodies.' JOURNAL OF VIROLOGY, Vol. 71, No. 1, January 1997, pages 720-725, XP002103150, cited in the application.
3. The subjects of Claims 1-9 are considered novel and inventive in relation to the cited prior art. None of the search report citations discloses or suggests a method that has all the steps specified in Claim 1 (PCT Article 33(2) and (3)).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

intended for in vivo gene therapy (see, for example, page 725, last paragraph), a person skilled in the art would modify the packing cell so that it contains a therapeutic gene either instead of or in addition to the β -galactosidase gene, without thereby being inventive.

Claim 17 therefore lacks the necessary inventive step (PCT Article 33(3)).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

4. Documents D1 and D2 describe cell-specific retroviral vectors (SNV) which have on their surfaces a single-chain antibody fragment (scFv) that is fused with the Env-protein. D2 also describes stable packing cell lines that produce said vectors.

Retroviral vectors produced according to the method as per Claim 1 do not differ from the vectors known from D1 and D2. Both bear, in addition to the wild-type surface envelope protein, the chimerical scFv-Env surface protein. The pharmaceutical use of vectors for gene therapy is mentioned in D1 (see, for example, page 15, line 24, to page 16, line 11). Claims 10-12 are therefore not novel (PCT Article 33(2)).

The use of the vectors of D1 to produce a drug to combat the illnesses listed in Claim 13 is not disclosed. Given the general teaching of D1, however, it would have been obvious to a person skilled in the art, who would have been immediately able to use the retroviral vectors to treat such well-known illnesses as cystic fibrosis or AIDS (PCT Article 33(3)).

The packing cell according to Claim 14 does not contain any additional features which distinguish it from the packing cell DSgpl3-cx1-TC25 described in D2. The cell line DSgpl3-cx1-TC25 also contains the β -galactosidase gene, which is introduced by the vector into the cell to be transduced.

Consequently, the subject matter of Claims 14-16 and 18 is not novel over D2 (PCT Article 33(2)).

Since the vector cell system described in D2 is

THIS PAGE BLANK (USPTO)

17
10

VERTRAG ÜBER DIE INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS

REC'D 09 FEB 2000

PCT

WIPO PCT

INTERNATIONALER VORLÄUFIGER PRÜFUNGSBERICHT

(Artikel 36 und Regel 70 PCT)

Aktenzeichen des Anmelders oder Anwalts 158-2 PCT	WEITERES VORGEHEN siehe Mitteilung über die Übersendung des internationalen vorläufigen Prüfungsbericht (Formblatt PCT/IPEA/416)	
Internationales Aktenzeichen PCT/DE98/03543	Internationales Anmeldedatum (Tag/Monat/Jahr) 27/11/1998	Prioritätsdatum (Tag/Monat/Tag) 28/11/1997
Internationale Patentklassifikation (IPK) oder nationale Klassifikation und IPK C12N15/86		
Anmelder BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND ... et al		



- Dieser internationale vorläufige Prüfungsbericht wurde von der mit der internationale vorläufigen Prüfung beauftragte Behörde erstellt und wird dem Anmelder gemäß Artikel 36 übermittelt.
- Dieser BERICHT umfaßt insgesamt 5 Blätter einschließlich dieses Deckblatts.

☐ Außerdem liegen dem Bericht ANLAGEN bei; dabei handelt es sich um Blätter mit Beschreibungen, Ansprüchen und/oder Zeichnungen, die geändert wurden und diesem Bericht zugrunde liegen, und/oder Blätter mit vor dieser Behörde vorgenommenen Berichtigungen (siehe Regel 70.16 und Abschnitt 607 der Verwaltungsrichtlinien zum PCT).

 Diese Anlagen umfassen insgesamt Blätter.

- Dieser Bericht enthält Angaben zu folgenden Punkten:

- I ☒ Grundlage des Berichts
- II ☐ Priorität
- III ☐ Keine Erstellung eines Gutachtens über Neuheit, erfinderische Tätigkeit und gewerbliche Anwendbarkeit
- IV ☐ Mangelnde Einheitlichkeit der Erfindung
- V ☒ Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderische Tätigkeit und der gewerbliche Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung
- VI ☐ Bestimmte angeführte Unterlagen
- VII ☐ Bestimmte Mängel der internationalen Anmeldung
- VIII ☐ Bestimmte Bemerkungen zur internationalen Anmeldung

Datum der Einreichung des Antrags 18/06/1999	Datum der Fertigstellung dieses Berichts 03.02.00
Name und Postanschrift der mit der internationalen vorläufigen Prüfung beauftragten Behörde:  Europäisches Patentamt D-80298 München Tel. +49 89 2399 - 0 Tx: 523656 epmu d Fax: +49 89 2399 - 4465	Bevollmächtigter Bediensteter Huber, A Tel. Nr. +49 89 2399 8173 

THIS PAGE BLANK (USPTO)

I. Grundlage des Berichts

1. Dieser Bericht wurde erstellt auf der Grundlage (*Ersatzblätter, die dem Anmeldeamt auf eine Aufforderung nach Artikel 14 hin vorgelegt wurden, gelten im Rahmen dieses Berichts als "ursprünglich eingereicht" und sind ihm nicht beigelegt, weil sie keine Änderungen enthalten.*):

Beschreibung, Seiten:

1-28,28a ursprüngliche Fassung

Patentansprüche, Nr.:

1-18 ursprüngliche Fassung

Zeichnungen, Blätter:

1/5-5/5 ursprüngliche Fassung

2. Aufgrund der Änderungen sind folgende Unterlagen fortgefallen:

- ☐ Beschreibung, Seiten:
☐ Ansprüche, Nr.:
☐ Zeichnungen, Blatt:

3. ☐ Dieser Bericht ist ohne Berücksichtigung (von einigen) der Änderungen erstellt worden, da diese aus den angegebenen Gründen nach Auffassung der Behörde über den Offenbarungsgehalt in der ursprünglich eingereichten Fassung hinausgehen (Regel 70.2(c)):

4. Etwaige zusätzliche Bemerkungen:

V. Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Feststellung

Neuheit (N)	Ja: Ansprüche	1-9, 13, 17
	Nein: Ansprüche	10-12, 14-16, 18
Erfinderische Tätigkeit (ET)	Ja: Ansprüche	1-9
	Nein: Ansprüche	10-18
Gewerbliche Anwendbarkeit (GA)	Ja: Ansprüche	1-18
	Nein: Ansprüche	

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2. Unterlagen und Erklärungen

siehe Beiblatt

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Zu Punkt V

Begründete Feststellung nach Artikel 35(2) hinsichtlich der Neuheit, der erfinderischen Tätigkeit und der gewerblichen Anwendbarkeit; Unterlagen und Erklärungen zur Stützung dieser Feststellung

1. Vorliegende Anmeldung betrifft ein Verfahren zur Herstellung zellspezifischer retroviraler Vektoren mit Antikörper-Erkennungsdomänen (scFv), die durch dieses Verfahren erhältlichen Vektoren, deren Verwendung, sowie Verpackungszellen zur Gewinnung dieser Vektoren.
2. Es wird auf die folgenden Dokumente verwiesen:

D1: WO 95 23846 A (UNIV MEDICINE & DENTISTRY OF N) 8. September 1995

D2: CHU T. H. ET AL.: 'Toward highly efficient cell-type- specific gene transfer with retroviral vectors displaying single-chain antibodies.' JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 71, Nr. 1, Januar 1997, Seiten 720-725, XP002103150 in der Anmeldung erwähnt

3. Der Gegenstand von Ansprüchen 1-9 wird als neu und erfinderisch gegenüber dem zitierten Stand der Technik angesehen. In keinem der im Recherchenbericht zitierten Dokumente ist ein Verfahren, das alle in Anspruch 1 genannten Schritte aufweist, offenbart oder nahegelegt (Art. 33(2) und (3) PCT).
4. Dokumente D1 und D2 beschreiben zellspezifische Retrovirusvektoren (SNV), die ein mit dem env-Protein fusioniertes einkettiges Antikörperfragment (scFv) an ihrer Oberfläche aufweisen. D2 beschreibt außerdem stabile Verpackungszelllinien, die diese Vektoren produzieren.

Retrovirale Vektoren, die nach der Methode gemäß Anspruch 1 hergestellt werden, unterscheiden sich nicht von den aus D1 und D2 bekannten Vektoren. Beide tragen neben dem Wildtyp-Oberflächenhüllprotein auch das chimäre scFv-

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Env Oberflächenprotein. Die pharmazeutische Verwendung der Vektoren zur Gentherapie ist in D1 erwähnt (siehe z.B. Seite 15, Zeile 24 bis Seite 16, Zeile 11). Ansprüche 10-12 sind daher nicht neu (Art. 33(2) PCT).

Die Verwendung der Vektoren von D1 zur Herstellung eines Arzneimittels gegen die in Anspruch 13 genannten Krankheiten ist nicht offenbart. Aufgrund der allgemeinen Lehre von D1 wäre es für den Fachmann jedoch naheliegend und er wäre ohne weiteres in der Lage, die retroviralen Vektoren zur Therapie von so bekannten Krankheiten wie z.B. Cystische Fibrose oder AIDS einzusetzen (Art. 33(3) PCT).

Die Verpackungszelle nach Anspruch 14 enthält keine zusätzlichen Merkmale, durch die sie sich von der in D2 beschriebenen Verpackungszelle DSgp13-cxl-TC25 unterscheidet. Die Zelllinie DSgp13-cxl-TC25 enthält außerdem das β -Galaktosidase Gen, das durch den Vektor in die zu transduzierende Zelle eingeführt wird. Der Gegenstand von Ansprüchen 14-16 und 18 ist daher nicht neu gegenüber D2 (Art. 33(2) PCT).

Da das in D2 beschriebene Vektor-Zellsystem zur in vivo Gentherapie vorgesehen ist (siehe, z. B., Seite 725, letzter Absatz) würde der Fachmann ohne erfinderisches Zutun die Verpackungszelle so modifizieren, daß sie entweder anstelle des β -Galaktosidase Gens oder zusätzlich dazu ein therapeutisches Gen enthält.

Anspruch 17 fehlt es daher an der erforderlichen erfinderischen Tätigkeit (Art. 33(3) PCT).

THIS PAGE BLANK (USPTO)

PCTVELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales BüroINTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/86, 5/10, A61K 48/00		A2	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/28489 (43) Internationales Veröffentlichungsdatum: 10. Juni 1999 (10.06.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/03543 (22) Internationales Anmeldedatum: 27. November 1998 (27.11.98) (30) Prioritätsdaten: 197 25 854.6 ✓ 28. November 1997 (28.11.97) DE (71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND letztvertreten durch DEN PRÄSIDENTEN DES PAUL-EHRLICH INSTITUTS PROF. DR. R. KURTH [DE/DE]; Paul-Ehrlich-Strasse 51-59, D-63225 Langen (DE). (72) Erfinder; und (75) Erfinder/Anmelder (nur für US): CICHUTEK, Klaus [DE/DE]; Großer Hasenpfad 114, D-60598 Frankfurt am Main (DE). ENGELSTÄDTER, Martin [DE/DE]; Isarstrasse 8, D-63110 Rodgau (DE). (74) Anwälte: VOSSIUS, Volker usw.; Holbeinstrasse 5, D-81679 München (DE).		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG). Veröffentlicht <i>Ohne internationalen Recherchenbericht und erneut zu veröffentlichen nach Erhalt des Berichts.</i>	
(54) Title: CELL-SPECIFIC RETROVIRAL VECTORS WITH ANTIBODY DOMAINS AND METHOD FOR THE PRODUCTION THEREOF FOR SELECTIVE GENE TRANSFER (54) Bezeichnung: ZELLSPEZIFISCHE RETROVIRALE VEKTOREN MIT ANTIKÖRPERDOMÄNEN UND VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG FÜR DEN SELEKTIVEN GENTRANSFER (57) Abstract <p>The invention relates to cell- specific retroviral vectors with antibody domains (scFv), which are suitable for cell-specific transduction of a selected mammal cell type (cell targeting). The invention also relates to a method for the production of cell-specific retroviral vectors and to the use thereof in gene transfers in selected cells. The invention further relates to retroviral packaging cells to obtain inventive cell-specific retroviral vectors.</p> (57) Zusammenfassung <p>Die Erfindung betrifft zellspezifische retrovirale Vektoren mit Antikörpererkennungsdomänen (scFv), die für die zellspezifische Transduktion eines ausgewählten Säugerzelltyps geeignet sind (Zelltargeting), Verfahren zur Herstellung der zellspezifischen retroviralen Vektoren und ihre Verwendung zur Genübertragung in ausgewählte Zellen. Die Erfindung betrifft ferner retrovirale Verpackungszellen zur Gewinnung der erfindungsgemässen zellspezifischen retroviralen Vektoren.</p>			

LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

Zellspezifische retrovirale Vektoren mit Antikörperdomänen und Verfahren zu
ihrer Herstellung für den selektiven Gentransfer

5

Die Erfindung betrifft zellspezifische retrovirale Vektoren mit Antikörpererkennungsdomänen (scFv), die für die zellspezifische Transduktion eines ausgewählten Säugerzelltyps geeignet sind (Zelltargeting), Verfahren zur Herstellung der zellspezifischen retroviralen Vektoren und
10 ihre Verwendung zur Genübertragung in ausgewählte Zellen. Die Erfindung betrifft ferner retrovirale Verpackungszellen zur Gewinnung der erfindungsgemäßen zellspezifischen retroviralen Vektoren.

Die Mehrheit der retroviralen Vektoren, die in der gentherapeutischen Forschung zur Zeit
15 benutzt werden, stammen vom amphotropen Maus-Leukämie-Virus (MLV) ab. Der Wirtszellbereich des amphotropen MLV wird durch das Oberflächen-Hüllprotein (SU) bestimmt, das vom env-Gen codiert wird. Die Proteinprodukte des env-Gens bilden die äußere Hülle des retroviralen Vektors. Die SU-Proteine interagieren mit, d.h. sie binden an ein bestimmtes Protein (Rezeptor) auf der Oberfläche der Wirtszelle. Die env-Genprodukte des
20 amphotropen MLV erlauben den Gentransfer in eine große Anzahl unterschiedlicher Säugerzellen. Ein selektiver Gentransfer in bestimmte Zell- oder Gewebetypen des Menschen oder anderer Säuger ist mit amphotropen MLV-Vektoren aber nicht möglich, weil der Rezeptor für die MLV-Hüllproteine auf der Oberfläche der Säugerzellen, welches den Eintritt von amphotropen MLV-Vektoren und den Gentransfer vermittelt, auf fast allen diesen Zellen
25 zu finden ist. Der Wirtszellbereich des amphotropen MLV ist daher nicht spezifisch.

Eine Wirtszellspezifität ist z.B. für den gentherapeutischen Einsatz jedoch von Vorteil, da bei einer Gentherapie außerhalb des Organismus (*ex vivo*) (Anderson et al., *Science* 256 (1992), 808-813; Yu et al., *H. Gene Therapy* 8 (1997), 1065-1072) aufwendige Aufreinigungen von
30 Zellen vermieden werden. Für den Therapie-, Diagnostik- oder Impf-Einsatz *in vivo* ist erwünscht, daß die retroviralen Vektoren gezielt die gewünschten Wirtszellen ansteuern und anschließend das therapeutische Gen übertragen. Eine Einengung des Wirtszellbereichs des

amphotropen MLV konnte durch Modifikation des Oberflächenhüllproteins erreicht werden. Eine Modifikation des Oberflächenhüllproteins wurde durch die Fusion mit einer Hormondomäne durchgeführt. Es fand eine Transduktion der Zellen statt, die den spezifischen Hormonrezeptor trugen (Kasahara et al., *Science* 266 (1994), 1373-1375). Ferner wurde das
5 Oberflächenhüllprotein durch Fusion mit einem einkettigen Antikörperfragment (*single chain variable fragment*, nachfolgend auch "scFv" bezeichnet) modifiziert. Das Fragment repräsentierte die antigenbindende Domäne eines Antikörpers und ist ein Fusionsprotein, das aus den variablen Domänen Vh und Vl eines monoklonalen Antikörpers zusammengesetzt ist. Die beiden Domänen sind über ein Glycin- und Serin-Oligopeptid [-(ser-gly4)3-gly-]
10 verknüpft, das die korrekte Faltung des Fusionsproteins ermöglicht (Huston et al., *Methods Enzymol.* 203 (1991), 46-88, Whitlow et al., *Methods: A companion to Methods Enzymol.* 2 (1991), 97-105). Alle bisher durchgeführten Modifikationen des MLV-Oberflächenhüllproteins mit einem scFv zeigten, daß es zwar zu einer Bindung der Vektoren an die Wirtszielzelle kam, nicht jedoch zu einem Eintritt in die Zelle (Russel et al., *Nucleic Acid Res.* 21 (1993), 1081-
15 1985). Weiterhin ist bekannt, daß das Oberflächenhüllprotein des MLV generell keine umfangreichen Modifikationen erlaubt (Cosset et al., *J. Virol* 69 (1995), 6314-632). Modifikationen, bei denen ein Teil der Bindungsdomäne des MLV-SU-Proteins ersetzt wurde, führten oft zu einer inkorrekten Prozessierung und somit zu einem defekten Transport des SU-Proteins an die Zelloberfläche (Weiss et al., *In J.A.Levy (ed.). The Retroviridae* 2 (1993), 1-
20 108 ; Morgan et al., *J. Virol.* 67 (1993), 4712-4721; Russel et al., *Nucleic Acid Res.* 21 (1993), 1081-1985). Die Entwicklung zellspezifischer retroviraler Vektoren auf Basis des MLV mit veränderten Oberflächenhüllproteinen ist daher wenig erfolgversprechend.

Retrovirale Vektoren auf Basis des Milznekrosevirus SNV ("Spleen Necrosis Virus") sind für
25 einen gezielten Gentransfer in z.B. humane Zellen geeigneter, da das Oberflächen-Hüllprotein des SNV umfangreiche Modifikationen erlaubt und auch dann noch korrekt prozessiert wird (Martinez und Dornburg, *Virol.* 208 (1995), 234-241; Chu et al., *Gene Therapie* 1 (1994), 292-299; Chu und Dornburg, *J. Virol.* 69 (1995), 2659-2663). Zur Herstellung derartiger Vektoren benötigt man mindestens zwei Komponenten. Zum einen ist ein sog.
30 Expressionskonstrukt herzustellen, das eine Verpackung in und den Transfer durch einen Retrovirus erlaubt. Das Expressionskonstrukt umfaßt ein kodierendes DNA-Fragment des gewünschten Genprodukts, z.B. ein Gen für die Gentherapie oder als Impfstoff. Das Expressionskonstrukt muß eine Nukleotidsequenz umfassen, die als Verpackungssignal psi (ψ)

bezeichnet wird und die effiziente Verpackung der mRNA in retrovirale Partikel steuert. Ferner benötigt man eine Verpackungs- oder Helferzelle, welche die gag-, pol- und env-Genprodukte des SNV bereitstellt, ohne daß die gag-, pol- und env-Gene in ein Retrovirus verpackt werden können. Die in der Verpackungszelle befindlichen gag-, pol- und env-Gene müssen psi-negativ
5 sein. Nach Überführung des Expressionskonstruktes durch Transfektion der entsprechenden Plasmid-DNA in die Verpackungszellen werden retrovirale Partikel in den Zellkulturüberstand abgegeben, die das Expressionskonstrukt enthalten und nur dieses, nicht jedoch die gag-, pol-, und env-Gene in die Zielzelle überführen können. Diese Vektoren sind vermehrungsunfähig und durchlaufen lediglich eine Replikationsrunde. Das allgemeine Verfahren zur Herstellung von
10 vermehrungsunfähigen retroviralen Vektoren ist Stand der Technik (Weiss et al., *In J.A. Levy* (ed.). *The Retroviridae* 2 (1993), 1-108 ; Morgan et al., *J. Virol.* 67 (1993), 4712-4721; Russel et al., *Nucleic Acid Res.* 21 (1993), 1081-1985; Cosset et al., *J. Virol.* 69 (1995; Martinez und Dornburg, *Virol.* 208 (1995), 234-241; Chu et al., *Gene Therapie* 1 (1994), 292-299; Chu und Dornburg, *J. Virol.* 69 (1995), 2659-2663).

15 Auch der Tropismus (Wirtszellspezifität) des Milznekrosevirus wird durch das Oberflächenhüllprotein (SU-Protein) bestimmt, das vom env-Gen des SNV codiert wird. Das Wildtyp-SNV-Oberflächenhüllprotein läßt keinen selektiven Gentransfer in bestimmte Zellen oder Gewebe des Menschen zu, da das spezifische Empfängerprotein (Rezeptor) nicht auf der
20 Oberfläche von humanen Zellen vorhanden ist (Dornburg, *Gene Therapie* 2 (1995), 1-10). Deshalb wurde ein Verfahren entwickelt, um das SU-Protein des SNV gegen die antigenerkennende Domänen von Antikörpern zu ersetzen. Diese [SNV-scFV-Env]-Vektoren mit den zwei bisher bekannten unterschiedlichen scFv waren in der Lage, das psi-positive Reportergen, die bakterielle β -Galaktosidase, in die ausgewählte humanen Zielzellen zu
25 übertragen. Diese scFv sind gegen das Hapten Dinitrophenol (DNP) bzw. gegen ein unbekanntes Oberflächenmolekül auf Colon-CA-Zellen und anderen Krebszellen gerichtet. (Chu et al., *Gene Therapie* 1 (1994), 292-299; Chu et al., *BioTechniques* 18 (1995), 890-899; Chu und Dornburg, *J. Virol.* 71 (1997), 720-725). Es wurde eine Verpackungszelllinie (DSH-CXL) entwickelt, die sowohl die psi-negativen SNV-Gene gag, pol und env als auch das psi-
30 positive Reportergen-Expressionskonstrukt (pCXL) enthält. Nach Transfektion der Verpackungszelle mit der Plasmid-DNA eines weiteren env-Expressionsgens (pTC53), bei dem das gesamte Oberflächen-Hüllprotein gegen ein einkettiges Antikörperfragment (scFv) ersetzt wurde, wurden retrovirale Vektoren in den Zellüberstand abgegeben, die auf ihrer Oberfläche

neben dem Wildtyp-Oberflächenhüllprotein auch das chimäre [scFv-Env]-Oberflächenprotein trugen. Mit Hilfe dieser Vektoren konnte das Reportergen in die für die scFv-spezifischen Zielzellen, Hundeosteosarkomzellen (D17) die mit DNP konjugiert waren, bzw. HeLa-Zellen (humane Cervixkarzinomzellen) transferriert werden. Bei diesem beschriebenen Verfahren zur Herstellung zellspezifischer retroviraler Vektoren ist jedoch von Nachteil, daß nur bereits bekannte und klonierte scFv verwendet werden können. Ferner wurde von uns festgestellt, daß nicht jedes scFv als Teil eines [SNV-scFv-Env]-Vektors für die Zelltransduktion (Übertragen des gewünschten Gens auf die Zielzelle) geeignet ist.

- 10 Der Gentransfer in Säugerzellen mittels Retroviren hat generell folgende Vorteile:
- Es wird in der Regel eine Kopie des gewünschten Gens in die Säugerzelle überführt.
 - Das gewünschte Gen wird im allgemeinen ohne Mutation oder Rearrangements übertragen.
 - Es erfolgt ein stabiler Einbau des gewünschten Gens in das Genom der Zielzelle.

Weiterhin ist erwünscht, daß der retrovirale Vektor eine bestimmte Zellspezifität besitzt, durch die das z.B. therapeutische Gen in eine ausgewählte Zellpopulation eingeführt werden kann.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, zellspezifische retrovirale Vektoren mit Antikörpererkennungsdomänen für den selektiven Gentransfer in Säugerzellen sowie ein universelles Verfahren zu ihrer Herstellung bereitzustellen. Mit Hilfe dieser Vektoren gelingt es, den Gentransfer zu verbessern. Der Erfindung liegt ferner die Aufgabe zugrunde retrovirale Verpackungszellen zur Gewinnung der erfindungsgemäßen Vektoren bereitzustellen. Die Lösung dieser Aufgaben ergibt sich aus den Patentansprüchen, der nachfolgenden Beschreibung und den Figuren.

- 25 Die Aufgabe wird durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung zellspezifischer retroviraler Vektoren gelöst, umfassend die folgenden Schritte: a) Immunisieren eines Säugetiers mit einer oder mehreren Zellpopulation(en), b) Isolieren von RNA aus dem immunisierten Säugetier, umfassend die B-Zell-RNA, c) Herstellen von cDNA-Abschnitte der variablen Regionen der schweren und leichten Kette der Immunglobuline aus der isolierten RNA mittels RT-PCR mit Primern für die schwere und leichte Kette der Immunglobuline, wobei die Primer die Nukleinsäuresequenz für einen Oligopeptidlinker umfassen, d) Ligieren der cDNA-Abschnitte zu scFv-cDNAs, e) Ligieren der scFv-cDNAs in einen Phagemid-Vektor und Transformieren eines Wirtsbakteriums mit dem Phagemid-Vektor, f) Isolieren von Phagen,

die an die in Schritt a) verwendete(n) Zellpopulation(en) binden, durch Selektion, g) Isolieren von zellspezifischen Phagen aus den in Schritt f) erhaltenen Phagen, die nur an die in Schritt a) verwendete(n) Zellpopulation(en) binden, durch Selektion, h) Ausschneiden der scFv-codierenden DNA-Fragmente aus den in Schritt g) erhaltenen zellspezifischen Phagen und
5 Ligieren in einen psi-negativen retroviralen Env-Expressionsvektor, i) Transformieren des erhaltenen Env-scFv-Expressionsvektors in eine Verpackungszelle, und j) Isolieren der von der Verpackungszelle sezernierten retroviralen Vektoren.

Gegebenenfalls umfaßt das erfindungsgemäße Verfahren weiter die Vereinzelung der in Schritt
10 g) erhaltenen zellspezifischen Phagen. Gegebenenfalls umfaßt das erfindungsgemäße Verfahren weiter den Schritt: k) Isolieren der von der Verpackungszelle sezernierten retroviralen Vektoren, die die Zellen der Zellpopulation(en) transduzieren durch Selektion. Ferner können die Schritte f) und/oder g) mindestens einmal wiederholt werden.

15 Bevorzugt ist ein Verfahren, wobei das immunisierte Säugetier ausgewählt ist aus der Gruppe Maus, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen, Ziege oder Schaf. Bevorzugt ist ebenfalls ein Verfahren, bei dem die Zellpopulation(en) ausgewählt ist aus der Gruppe Mensch, Maus, Ratte, Schaf, Rind oder Schwein. Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem die Zellpopulation(en) ausgewählt ist (sind) aus der Gruppe T-Zellen, Epithelzellen, Muskelzellen,
20 Stammzellen, neurale Zellen, hämatopoietische Zellen, Karzinomzellen oder Leberzellen. Bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem das env-Gen vom Milznekrosevirus (SNV) stammt. Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem der Expressionsvektor der Vektor mit der Bezeichnung pTC53 ist.

25 Die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlichen zellspezifischen retroviralen Vektoren können als Arzneimittel verwendet werden. Bevorzugt ist die Verwendung zur Herstellung eines Arzneimittels zur Gentherapie, Impftherapie oder Diagnostik. Besonders bevorzugt ist die Therapie der Cystischen Fibrose, des ADA-Mangels, von HIV-Infektionen, Leukämie, chronischer Granulomatose.

30 Die Erfindung wird ferner glöst durch die Bereitstellung von retroviralen Verpackungszellen zur Gewinnung der erfindungsgemäßen retroviralen Vektoren, transformiert sowohl mit einem oder mehreren psi-negativen Expressionskonstrukt(en), die die gag-, pol- und/oder env-

Genprodukte exprimieren, als auch mit einem psi-negativen Env-scFv-Expressionskonstrukt nach Anspruch 1 h). Bevorzugt ist eine Verpackungszelle, ferner umfassend ein psi-positives Expressionskonstrukt, umfassend ein Nukleinsäurefragment, das in die durch den retroviralen Vektor zu transduzierende Zelle eingeführt werden soll. Besonders bevorzugt ist eine Verpackungszelle, wobei das Nukleinsäurefragment ein therapeutisches Gen oder dessen DNA-Fragment und/oder ein Reportergen umfaßt. Insbesondere bevorzugt ist eine Verpackungszelle, wobei das therapeutische Gen oder dessen Nukleinsäurefragment das CFTR-, phox91-, ADA-, IL-16-, p53- oder revM10-Gen oder Impfgene z. B. rekombinantes gp120 und IL-16 umfaßt. Ferner insbesondere bevorzugt ist eine Verpackungszelle, wobei das Reportergen β -Galaktosidase, "Green Fluorescent Protein", Luciferase oder Neomycin umfaßt.

Die Abbildungen dienen der Erläuterung der Erfindung

Abb.1 zeigt schematisch die Env-scFv Expressionskonstrukt pTC53, pT-scFv und pT/zeo, deren Transfektion in die Verpackungszelle DSH-CXL, die die erfindungsgemäßen Vektoren sezerniert.

Abb.2 zeigt schematisch die Herstellung, Isolierung und Selektion der erfindungsgemäßen Vektoren.

Abb.3 ist eine schematische Darstellung eines Immunglobulins und das daraus resultierende scFv. Dargestellt sind weiterhin schematisch scFv-Display-Phagen und SNV-scFv-Env-Vektoren

Abb. 4 zeigt die Nukleinsäuresequenz von pTC53.

Der hier verwendete Begriff amphotropes Virus bedeutet Infektion und Replikation auf murinen und humanen Zellen, im Gegensatz zu ecotropen Viren, das nur auf murinen Zellen repliziert. Der hier verwendete Begriff retroviraler Vektor bedeutet replikationsdefizientes retrovirales Viruspartikel, das anstelle der retroviralen mRNA eine fremde eingeführte RNA eines Gens, z.B. eines therapeutischen Gens oder dessen Fragment oder eines Reportergens übertragen kann. Der hier verwendete Begriff Antikörpererkennungsdomäne (scFv) bedeutet Antigenbindestelle eines Antikörpers, umfassend Vh- und Vl-Kette. Der hier verwendete

Begriff SNV bedeutet Milznekrosevirus mit seinen Stämmen und Substämmen. SNV gehört zu den Reticolo Endotheliose Viren (REV) der Vögel, Typ D-Retrovirus.

- 5 Für die Bereitstellung der zellspezifischen Antikörpererkennungsdomänen (scFv) wird eine neue kombinatorische Phagen-cDNA-Bibliothek der variablen Domänen der leichten und schweren Ketten der Immunglobuline hergestellt. Dazu wird ein Säugetier, z.B. eine Maus, Ratte, ein Kaninchen, Meerschweinchen, Ziege oder Schaf, mit einem ausreichenden Titer einer oder mehrerer Zellpopulation(en) in üblicher Weise immunisiert. Die Zellpopulation ist die Zellart, die einen Oberflächenrezeptor ausbildet, an den die erfindungsgemäßen retroviralen
- 10 Vektoren spezifisch binden. Die Zellen können von einem von dem zu immunisierenden Säugetier verschiedenen Säugetier stammen, z.B. vom Menschen, der Maus, Ratte, dem Schaf, Rind oder Schwein. Die Zellen können solche Zellen sein, in der z.B. eine somatische Gentherapie, eine Impftherapie oder Diagnostik durchgeführt werden soll. Typische Beispiele solcher Zellen sind T-Zellen, Leberzellen, Muskelzellen, neurale Zellen, Fibroblasten,
- 15 Epithelzellen, Stammzellen oder hämatopoietische Zellen. Für die Immunisierung kann eine Zellpopulation oder mehrere Zellpopulationen gleichzeitig dem Säugetier verabreicht werden, je nachdem für welche Zellpopulationen(en) der erfindungsgemäße retrovirale Vektor spezifisch sein soll.
- 20 Für die Herstellung der cDNA-Bibliothek wird zuerst die B-Zell-RNA des immunisierten Säugetiers in bekannter Weise isoliert. Die mRNA-Sequenzen der für die Antigenerkennung verantwortlichen Regionen der schweren und leichten Kette (V_H und V_L) der Immunglobuline werden mittels reverser Transkription und anschließender Polymerase-Kettenamplifikation in üblicher Weise in cDNA umgeschrieben und vervielfältigt. Die Primerpaare und deren
- 25 Sequenzen für die V_H - und V_L -Regionen sind dem Fachmann bekannt. Sie sind z.B. im kommerziell erhältlichen Kit der Fa. Pharmacia enthalten, bzw. können den bekannten Datenbanken (EMBL) entnommen werden. Dem Fachmann ist bekannt, daß er für jede immunisierte Säugetierart verschiedene Primersequenzen verwenden muß. Die Sequenzen sind ebenfalls in den bekannten Datenbanken enthalten.. Die cDNA-Fragmente der V_H - und V_L -
- 30 Regionen werden dann mittels einer Ligasereaktion in üblicher Weise zu scFv-cDNAs verknüpft. Für den Fachmann ist ersichtlich, daß bei der Ligation unterschiedliche Kombinationen von cDNA-Fragmenten hergestellt werden. Die erhaltenen scFv-cDNAs können dann in einen Phagemid-Vektor z.B. pCANTA 5E Phagemid, Fa. Pharmacia kloniert

werden. Anschließend werden Wirtsbakterien z.B. E.coli TG1 mit dem Phagemid-Vektor transformiert.

Die von den Bakterien produzierten rekombinanten Phagen werden dann in üblicher Weise isoliert und auf das Vorhandensein von zellspezifischen scFv-Peptiden selektioniert. Die Phagen werden mit der Zellpopulation oder den Zellpopulationen in üblicher Weise in Kontakt gebracht, die für die Immunisierung verwendet worden sind. Die Phagen, die nicht an die Zellen binden, tragen kein spezifisches scFv-Peptid und werden durch Waschschr

Die Phagen, die an die Zellen binden, präsentieren das gewünschte scFv-Peptid auf ihrer Oberfläche und werden in üblicher Weise eluiert. Die Phagen, die das gewünschte scFv-Peptid präsentieren, werden vermehrt, indem man sie wieder in üblicher Weise die Wirtsbakterien infizieren läßt. Dieser Selektionsschritt kann ein oder mehrere Male wiederholt werden, um die bindenden Phagen anzureichern. Dieser Vorgang wird als "panning" bezeichnet. Die Phagen werden nach dem panning oder direkt nach dem ersten Selektionsschritt einer weiteren Selektion unterzogen. Dabei werden die Phagen mit einer oder mehreren anderen Zellpopulationen in Kontakt gebracht, die sich von den zur Immunisierung verwendeten Zellen unterscheiden. Die Phagen, die nicht an diese Zellen binden, präsentieren ein zellspezifisches scFv-Peptid. Sie werden in üblicher Weise aus dem Zellüberstand isoliert und für eine Wirtsbakterieninfektion zur Vermehrung verwendet. Auch dieser Selektionsschritt kann ein oder mehrere Male wiederholt werden (Marks et al., *Biotechnologie* 10 (1992), 779; Clackson et al., *Nature* 352 (1991), 624; Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222 (1991), 581; Chaudhary et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990), 1066; Chiswell et al., *TIBTECH* 10 (1992), 80; McCafferty et al., *Nature* 348 (1990), 552; Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988), 5879).

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen zellspezifischen retroviralen Vektoren dient die vorstehend beschriebene Phagen-cDNA-Bibliothek als Ausgangsmaterial. Die scFv-cDNAs der Phagen, die nach dem zweiten Selektionsschritt und den gegebenenfalls durchgeführten panning-Verfahren übriggeblieben sind, werden in üblicher Weise aus der Phagen-DNA ausgeschnitten und in ein retrovirales Env-Expressionsgen inseriert. Das retrovirale env-Expressionsgen kann vom SNV stammen. Ein typisches Beispiel für ein SNV-scFv-env-Expressionskonstrukt ist pTC53. Die Sequenz ist in Abbildung 4B gezeigt. Ein typisches Beispiel für ein Wildtyp(wt)-SNV-env-Expressionskonstrukt ist pIM29.

- Die Konstruktion der für die wt-SNV-ENV-Proteine z.B. pIM29 und die chimären SNV-scFv-ENV-Proteine kodierenden Expressionplasmide ist von Chu et al. (*J. Virol.* 71 (1997), 720-725) vorbeschrieben. Die Expression der für das wt-env-Gen kodierenden DNA wird von einem MLV-Promotor gesteuert. Die env-cDNA wurde über die Restriktionsschnittstellen SacII und AvrII aus einem für das komplette SNV-Virus kodierenden Plasmids ausgeschnitten und durch Insertion in einen Linker (L) eingefügt. Um eine korrekte Prozessierung des Proteins zu gewährleisten, enthält pIM29 die Polyadenylierungsstelle des Simianen Virus 40 (SV40). Von diesem Plasmid kann somit die Expression des wt-env-Gens erfolgen, so daß nach proteolytischer Spaltung eines Vorläuferproteins das äußere Glykoprotein (SU) und das Transmembranprotein (TM) vorliegt. Es können jedoch andere, dem Fachmann bekannte Plasmide, Promotoren, Linker, Polyadenylierungssignale und weitere für eine korrekte Prozessierung benötigte DNA-Elemente verwendet werden.
- Zur Exprimierung von SNV-scFv-ENV-Proteinen werden die in bekannter Weise erhaltenen scFv in ein SNV-ENV-Expressionskonstrukt z.B. pTC53 in üblicher Weise eingeführt. Die in pTC53 vorhandenen Restriktionserkennungstellen für die Enzyme SfiI und NotI ermöglichen die molekulare Klonierung von z.B. scFv zwischen SNV-env-Leader-Sequenz und dem für das Transmembranprotein (TM-Protein) kodierenden Bereich der DNA. Die im wt-ENV vorhandene Proteaseschnittstelle zwischen SU und TM ist in pTC53 deletiert, so daß ein Fusionsprotein exprimiert wird, das N-terminal aus dem einkettigen Antikörperframment und C-terminal aus dem SNV-TM besteht. Die regulatorischen Elemente wie MLV-Promotor und SV40-Polyadenylierungssignal sind identisch mit denen des pIM29-Vektors. Zur Verstärkung der Expression eines chimären env-Gens wird in dem Expressionsplasmid pTC53 eine adenovirale Leader-Sequenz z.B. AVtl (Sheay et al. *BioTechniques*, 15 (1993), 856-861) inseriert. Eine Zocin-Kassette (pSV2zeo; Fa. Invitrogen, Niederlande) dient der möglichen Selektionierung von stabil transfizierten Zellen, so daß einzelne Zellklone etabliert werden können.
- Das psi-negative SNV-scFv-env -Expressionskonstrukt kann mittels Elektroporation oder anderer bekannter Verfahren in üblicher Weise in Verpackungszellen eingeführt werden. Eine typische Verpackungszelle ist z.B. DSH-CXL. Die Verpackungszellen haben ferner psi-negative env, gag, pol-Expressionskonstrukte und für den gewünschten Gentransfer in die

spezifischen Zielzellen ein weiteres psi-positives Expressionskonstrukt, das z.B. ein Gen oder DNA-Fragment für die Gentherapie, Impftherapie oder ein Reportergen für die Diagnostik umfaßt. Nach Transfektion der Verpackungszellen kommt es zu einer transienten Expression und Abgabe der retroviren Vektoren, die neben natürlichen SU-Proteinen rekombinante SU-scFv-Proteine präsentieren, in den Zellkulturüberstand. Die retroviren Vektoren können dann in üblicher Weise zur Transduktion der Zielzelle, d.h. der Zellpopulation, die zur Immunisierung verwendet wurde, eingesetzt werden. Gegebenenfalls kann dieser Schritt ein weiterer Selektionsschritt sein. Nur die erfindungsgemäßen retroviren Vektoren, die die Zielzelle in ausreichender Weise transduzieren, werden weiter verwendet. Diese Vektoren können einem weiteren Selektionsschritt unterzogen werden. Die Vektoren können in üblicher Weise zur Transduktion von anderen Zellpopulationen als der Zellpopulation, mit der das Säugetier immunisiert wurde, eingesetzt werden. Die Vektoren, die nicht die anderen Zellen transduzieren, sondern nur die Zielzellen, können also in einem doppelten Selektionsschritt erhalten werden.

Für die Etablierung von stabilen Verpackungszelllinien, welche die erfindungsgemäßen retroviren Vektoren konstitutiv abgeben, kann ein Selektionsmarker, z.B. das Zeocin-Resistenzgen (Fa. Invitrogen), in üblicher Weise in das scFv-Expressionskonstrukt z.B. pTC53 inseriert werden. Die mit dem Zeocin-Resistenz-Gen versehenen scFv-Expressionskonstrukte werden mittels z.B. der Liposomen-Technik (Lipofectamin, Gibco BRL) in die Verpackungszellen transferiert. Nach einer ca. zwei-wöchigen Selektion der Transfektanten in Zeocin-haltigem Kulturmedium können Zellklone etabliert werden, die je nach scFv-cDNA-Fragment Zielzellpopulationen mit einem Titer von etwa 10^4 - 10^6 retroviren Vektoren pro ml transduzierten.

Das mit den erfindungsgemäßen retroviren Vektoren in die Zielzellpopulation oder -populationen transduzierte Gen kann z.B. die RNA eines therapeutischen Gens oder dessen Fragment sein. Therapeutische Gene können z.B. das CFTR-Gen, das ADA-Gen, der LDL-Rezeptor, β -Globin, Faktor VIII oder Faktor IX, das Dystrophin-Gen sein. Im Falle des CFTR-Gens wären die Zielzellen z.B. die Lungenepithelzellen, beim ADA-Gen die Stammzellen des Knochenmarks oder T-Lymphocyten, beim LDL-Rezeptor die Leberzellen, beim Dystrophin-Gen die Skelettmuskelzellen, beim β -Globin-Gen die hämopoietischen Stammzellen, beim Faktor VIII oder Faktor IX die Fibroblasten und Leberzellen. Dem

Fachmann ist ersichtlich, daß diese Aufzählung nur eine Auswahl der therapeutischen Gene darstellt und andere Gen ebenfalls für eine Gentherapie verwendet werden können. Die DNA-Fragmente eines therapeutischen Gens umfassen z.B. Antisense-Nukleinsäuren oder Ribozyme. DNA-Fragmente können ferner Bereiche eines Gens umfassen, die die

5 Trinukleotidwiederholungen von z.B. des Fragile X Gens enthalten.

Ferner kann die RNA eines Reportergens, z.B. β -Galaktosidase, GFP, Luciferase oder Neomycin in die erfindungsgemäßen retroviralen Vektoren eingeführt werden. Die Reportergene ermöglichen, festzustellen, ob die Zielzellen mit den retroviralen Vektoren

10 transduziert worden sind.

Ferner kann die RNA eines Gens oder dessen Fragment zu Impfzwecken in die Zielzelle transduziert werden. Ein typisches "Impfgen" ist z.B. das rekombinante gp120 oder gp160 von HIV. Die Transduzierung von Immunzellen mit diesen Genen oder Fragmenten regt zu einer

15 Antikörperbildung gegen die viralen Genprodukte an.

Die erfindungsgemäßen Vektoren können z.B. durch i.v.- oder i.m.-Injektionen appliziert werden. Es können jedoch auch die erfindungsgemäßen Verpackungszellen in z.B. Organoide (Teflonbeutel) eingeschlossen werden, die dann in den Organismus eingepflanzt werden und in

20 die Blutbahn oder ins Gewebe die erfindungsgemäßen Vektoren sezernieren. Weitere Applikationsformen sind für den Fachmann offensichtlich.

Die erfindungsgemäße retrovirale Verpackungszelle zur Gewinnung der erfindungsgemäßen pseudotypisierten retroviralen Vektoren wird bereitgestellt, indem eine Zelllinie, z.B. eine

25 humane Zelllinie mit den psi-negativen Expressionskonstrukten, die die gag- und pol-Genprodukte des SNV exprimieren, und mit dem psi-negativen SNV-Env-Expressionskonstrukt und/oder psi-negativen SNV-scFv-env-Expressionskonstrukt, in üblicher Weise transfiziert wird.

Ferner können Verpackungszellen verwendet werden, die bereits die psi-negativen Expressionskonstrukte für die gag und pol-Genprodukte enthalten. In solche Verpackungszellen müssen dann nur das psi-negative Expressionskonstrukt für die Virushülle und das psi-positive Expressionskonstrukt für die in die Zielzelle zu transduzierende

30

Nukleinsäuresequenz transfigiert werden. Dem Fachmann sind die Verfahren zur Transfigektion der Expressionskonstrukte bekannt. Von den erfindungsgemäßen Verpackungszellen werden retrovirale Vektorpartikel in den Zellüberstand abgegeben, die das Expressionskonstrukt enthalten nicht jedoch die Konstrukte, die für die GAG-, POL- und ENV-Proteine kodieren. In
5 die Zielzelle wird somit nur das gewünschte z.B. therapeutische Gen oder Reportergergen überführt.

Die dargestellte Erfindung eröffnet die folgenden Möglichkeiten:

- Gene, Gen-Fragmente oder sonstige Nukleinsäuresequenzen können in ausgewählte
10 Säugerzellen überführt werden,
- weitere Effizienzsteigerungen des Nukleinsäuretransfers durch Verbesserung der env-Genkonstrukte können erreicht werden,
- Gentherapie-, Markierungs- und Impfstrategien können entwickelt werden, für die ein selektiver Nukleinsäuretransfer in ausgewählte Säugerzellen wünschenswert ist.

15 Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung und sind nicht als einschränkend aufzufassen:

1. Isolierung und Klonierung zellspezifischer scFv

Zur Herstellung, Isolierung und Selektion von zellspezifischen scFv wurde eine Maus mit der
20 humanen T-Zelllinie T-C8166 (Clapham et al., *Virology* 158 (1987), 44-51) in üblicher Weise immunisiert, die Milz entfernt und die RNA isoliert. Die Klonierung der scFv-cDNAs wurde mit dem kommerziell erhältlichen Kit der Fa. Pharmacia nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die erhaltenen Phagen wurden in üblicher Weise auf ihre Bindungseigenschaften gegenüber den Zielzellen untersucht. Es wurden 150 Phagen isoliert, die spezifisch an die
25 Zielzellen banden. Die 150 so erhaltenen zellspezifischen scFv wurden verwendet, um die erfindungsgemäßen SNV-scFv-Vektoren herzustellen.

2. Klonieren der spezifischen scFv-cDNA-Fragmente in Env-Expressionskonstrukte

Die scFv-cDNAs der 150 zellspezifischen scFv wurden in üblicher Weise aus der Phagemid-
30 DNA ausgeschnitten und jeweils in das Expressionskonstrukt pTC53 ligiert. pTC53 wurde erhalten durch Modifizierung des universellen eukaryotischen Vektors pRD114 (Chu et al., *J. Virol.* 71 (1997), 720-725; Sheay et al. *BioTechniques*, 15 (1993), 856-861; Chu et al., *BioTechniques*, 18 (1995), 890-895). In diesem Vektor wurde das SNV-wt-env-Gen bis auf

die für die Leader-Sequenz und das Transmembran-Protein kodierende c-DNA deletiert. Ein zusätzlich eingeführter Spacer ermöglicht die Insertion einer Fremd-DNA (hier die scFv-cDNA) im Anschluß an die ENV-Leader-Sequenz über die Restriktionserkennungsstelle NaeI. Die Sequenz von pTC53 ist in Abbildung 4 gezeigt. Für die Insertion der scFv-cDNA wurde das Env-Expressionskonstrukt pTC53 dahingehend modifiziert, daß Sfi I und Not I spezifische Restriktionsendonuklease-Erkennungsstellen in den Linker zwischen der SNV-Leader-Sequenz und der SNV-Transmembran-Sequenz (TM) in üblicher Weise eingefügt werden. Hierzu wird eine rekombinante PCR ausgehend von der DNA des Plasmids PKA1558 (Scov H. & Andersen K.B., 1993) und der für das anti Transferrinrezeptor-scFv kodierenden DNA in üblicher Weise durchgeführt, so daß über Nru I (5' und 3') eine Insertion des amplifizierten Fragments in das Nae I restringierte pTC53 möglich ist. Das so inserierte Fragment enthält die multiple Sfi I / Not I Klonierungsstelle, da die verwendeten Primer neben der endständigen Nru I Erkennungsstelle weiterhin eine benachbarte Sfi I bzw. Not I Erkennungsstelle beinhalten. Für die rekombinante PCR wurden folgende Primer verwendet

PKATFNNRu+:

5'-GGGCCCTCGCGAGCGGCCAGCGGCCGACATCAAGATGACCCAGTCTCCA-3'

Nru I

Sfi I

PKATFNNRu-:

5'-GGGCCCTCGCGATGCGGCCGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGTGCC-3'

Nru I

Not I

Die PCR-Bedingungen waren: 94°C/3 min, 94°C/1 min, 59°C/1 min, 72°C/1 min., 25 X Schleifen, 72°C/10 min und dann bis 4°C abkühlen. Das PCR-Fragment wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, aus der Gelmatrix extrahiert (Quiaex, Fa. Quiagen) und mit dem Nae I geöffneten Plasmid pTC53 in üblicher Weise ligiert.

Die scFv-cDNAs aus dem Phagemid (pCANTA 5E) wurden mittels der Restriktionsendonukleasen Sfi I und Not I ausgeschnitten. Dazu wurde Phagemid-Plasmid-DNA mittels bekannter Verfahren hergestellt und jeweils 8 µg Plasmid-DNA mit jeweils 60 U der Restriktionsendonukleasen Sfi I und Not I für 1,5h bei 50°C und anschließend 1,5h bei 37°C verdaut. Der Reaktionsansatz fand in einem Volumen von 200 µl statt, der mit 20 µl BSA (10fach konz.) und 20 µl Reaktionspuffer 3 (10fach konz.) supplementiert wurde. Nach

Beendigung der Reaktionszeit wurde der Ansatz in einem 1%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurde die scFv-cDNA spezifische Bande (ca 750bp) aus dem Agarosegel mittels bekannter Verfahren aufgereinigt.

- 5 Das aufgereinigte Fragment wurde mit dem ebenfalls mit den Reastriktionsendonukleasen Sfi I und Not I geöffneten Env-Expressionskonstrukt pTC53 ligiert. Dazu wurden äquimolare Mengen des scFv-cDNA-Fragments und pTC53-Fragments in einem 15µl Volumen mit 200 U T4-Ligase und 1,5µl 10-fach Ligase-Puffer supplementiert. Der Ansatz wurde bei 4°C Über Nacht inkubiert. Um eine effiziente Transformation von Bakterien zu ermöglichen, wurden die
- 10 Bakterienstämme TOP10F' und JS5 mit einer nach Hanahan (1983) modifizierten Methode kompetent gemacht. Nach dem Animpfen von 100 ml LB-Medium mit 500 µl einer Übernachtskultur wurde die Bakteriensuspension bei 37° C bis zu einer Dichte (OD₅₅₀) von 0,6 inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf Eis gekühlt, bei 6.000 rpm und 4° C pelletiert (Minifuge RF, Heraeus, Hanau) und in 40 ml TFB1-Puffer (30 mM KOAc, 100mM RbCl₂, 10 mM CaCl₂, 15 % Glycerin, pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt, danach sterilfiltriert)
- 15 resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten auf Eis und einer Zentrifugation bei 6.000 rpm und 4° C wurde das Bakterienpellet in 4 ml TFB2-Puffer (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl₂, 15 % Glycerin, pH 6,5 mit KOH-Lösung eingestellt, danach sterilfiltriert) resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde dann in Aliquots je 100 µl aufgeteilt und auf Trockeneis schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70° C. Zur Transformation wurden 100 µl der kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von 1-2 µl des jeweiligen Ligationsansatzes für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem anschließenden Temperaturschock (45 s bei 42° C anschließend 2 min auf Eis) wurden die Bakterien mit 500 µl SOC-Medium (GIBCO/BRL, Eggenstein) versetzt und bei 37° C für eine
- 20 Stunde zur Expression der Antibiotikaresistenz in einem Bakterienschüttler kultiviert. Die Bakteriensuspension wurde auf LB-Agarplatten, die mit dem Antibiotikum Ampicillin supplementiert waren, ausgestrichen und bei 37° C über Nacht inkubiert.
- 25

- Die Präparation von Plasmiden aus Bakterien (E.coli TopF10) erfolgte mit den QIAGEN-Plasmid-Kits der Firma QIAGEN, Hilden. Für die Präparation einer geringen Menge Plasmid-DNA wurden die Bakterien einer 15 ml-Übernachtskultur (LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin) mit den vom Hersteller gelieferten Lösungen lysiert und über eine
- 30

Anionenaustauscher-Säule (tip-20) gereinigt. Zur Gewinnung großer Mengen Plasmid-DNA (Maxi-Präparation) wurden 400 ml Übernachtskulturen angesetzt

3. Selektion der retroviren Vektoren

- 5 Transiente Transfektion der scFv-pTC53-Expressionskonstrukte in die Verpackungszelle DSH-CXL mittels Elektroporation: Für die Elektroporation wurden jeweils 2×10^6 DSH-CXL Zellen in 480 μ l PBS resuspendiert und in eine auf Eis gelagerten Gene-Pulser-Küvette (0,4 cm Elektrode, Lücke 50, Biorad, München) überführt. Danach wurden 20 μ g der rekombinanten Plasmid-DNA der Zelllösung zugegeben. Der Inhalt der Küvette wurde einem elektrischen Puls
- 10 in einem Elektroporator (Gene-Pulser Apparatus, Biorad, München) bei 270 V und 960 μ F ausgesetzt. Nach einer 10-minütigen Inkubation der Küvette auf Eis wurden die Zellen in 20 ml frisches Kulturmedium in eine mittlere Zellkulturflasche (Nunc, Wiesbaden) überführt. Am nächsten Tag wurden die DSH-CXL-Zellen mit frischem Medium versetzt und kultiviert.
- 15 Der Virus-haltige Überstand der Transfektanden wurde zur Transduktion der Zielzellen eingesetzt. Am Tag vor der Transduktion wurden die C8166-Zielzellen im Verhältnis 1:2 in frisches Medium umgesetzt. Die Überstände wurden mit einem 0,45 μ m Filter (Sartorius) steril filtriert. 7 ml des Überstandes wurden dann direkt zur Transduktion von 2×10^5 C8166-Zellen eingesetzt. Um die Anbindung der retroviren Vektoren an die Zelloberfläche zu stabilisieren
- 20 erfolgte eine Zugabe von 40 μ g/ml Polybren. Nach einer 2 stündigen Inkubation bei 37° C, wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in frisches Kultur-Medium überführt.

- Nachweis der β -Galaktosidase-Aktivität (X-Gal-Assay): Zur Überprüfung einer erfolgreichen Transduktion wurde nach 72 Stunden ein X-Gal-Assay nach der Methode von Sanes *et al.*
- 25 (1986) modifiziert durchgeführt. Der Zellkulturüberstand wurde abgezogen und die Zellen mit PBS ohne (Ca^{2+} und Mg^{2+}) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einer Fixierlösung (2 % Formaldehyd, 0,2 % Glutaraldehyd in PBS) für 5 min überschichtet und mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen in 3 ml X-Gal-Reaktionsmischung (1 mg/ml, 5 mM K-Ferricyanid, 5 mM K-Ferrocyanid, 2mM MgCl_2) resuspendiert. Nach einer ca. 4-stündigen
- 30 Inkubation des Ansatzes bei 37° C trat die Blaufärbung der transduzierten Zellen auf.

Von den 150 getesteten scFv-pTC53-Expressionskonstrukten waren 6 zellspezifisch (M8, K6, 7A5, 7E10, 6C3, 7B4). Das heißt es konnten pro zellspezifischem Konstrukt 10-20 blau-gefärbte C8166-Zellen erkannt werden. Das ist im Vergleich zu nicht zellspezifischen scFv-Klonen signifikant. Von 6 zellspezifischen scFv-Expressionskonstrukten wurden stabile Verpackungszelllinien generiert.

4. Etablierung stabiler Verpackungszelllinien

Herstellung des Zeocin-Resistenzgens mittels PCR ausgehend von DNA des Plasmids pSCVZeo (Fa. Invitrogen): Um Verpackungszellen nach einer stabilen Transfektion mit dem pTC53zeo-scFv-Plasmid auf eine stabile Expression des Resistenzgens zu selektionieren, wurde eine Zeocin-Kassette integriert. Hierzu wurde mittels rekombinanter PCR aus dem Vektor pZeoSV2 (+/-) der Firma Invitrogen (NV Leek, Niederlande) eine Zeocin-Kassette amplifiziert und mit den Restriktionsschnittstellen NdeI 5' und 3' versehen, so daß die Kassette anschließend in den NdeI restringierten Anteil des pUC19-Rückgrades des pTC53 inseriert werden konnte. Der PCR-Ansatz (100 µl) enthielt: 1 x PCR-Puffer (Taq: 10 mM Tris/HCl, pH 8,8, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,01% Gelatine, 10 µM (+)- und 10 µM (-)-Primer, 200 µM je Desoxynukleotid, 2,5 Einheiten Taq-Polymerase und 100 ng Plasmid-DNA oder. Es wurden folgende Oligonukleotide verwendet.

ZEO2184+NDE:

5'-GGAAATTCCCATATGGAATTCCCGTTACATAACTTACGGTAAATGGC-3'

Nde I

ZEO3258-NDE:

5'-GGAATTCCCATATGGAATTCCTCAGTCCTGCTCCTCGGCC-3'

Nde I

Die PCR-Bedingungen waren: 94°C/3 min, [94°C/1 min, 60°C/1 min, 72°C/1,5 min.] 30 X Zyklen, 72°C/10 min und 4°C Endtemperatur.

Insertion eines Zeocin-Resistenz-Gen in die im transienten Test positiven scFv-pTC53-Env-Expressionskonstrukte.

Transfektion mittels LipofectaminTM (GIBCO/BRL, Life Technologies, Eggenstein).

LipofectaminTM : N-[2-({2,5bis[-(3-aminopropyl)amino]-1-oxypentyl}amino)ethyl]-N,N-dimethyl-2,3-bis (9-octadecenyl-oxy)-1-propanaminium trifluoroacetat) /Dioleoyl-phosphatidylethanolamin; 3 : 1 (w/w)

Am Vortag der Transfektion wurden 1×10^6 Zellen in eine 60 mm-Zellkulturschale (Greiner, Nürtingen) ausgesät. Für die Transfektion wurden 1-5 µg (je nach Versuchansatz) der rekombinanten Plasmid-DNA in 200 µl serumfreiem Medium resuspendiert. Parallel dazu wurden 8-25 µl (je nach Versuchansatz) LipofectaminTM in 200 µl serumfreiem Medium verdünnt. Nach dem Vereinigen beider Lösungen, folgte eine Inkubation für 45 min bei RT. Das DNA-Liposomen-Gemisch wurde auf 2 ml Endvolumen aufgefüllt und auf die mit serumfreiem Medium gewaschenen Zellen gegeben. Daraufhin wurden die Zellen für 5 Stunden bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden 2 ml frisches Medium zugegeben, das die zweifache Konzentration an FCS enthielt. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

Zur Etablierung stabiler Verpackungszellklone wurden die Zellen 24 Stunden nach der Transfektion mit einem Selektionsmedium überschichtet. Das ZeocinTM-Resistenzgen (*Streptoalloteichus hinductamus* Bleomycin-Gen) wurde als Selektionmarker benutzt. Die Selektion erfolgte in DMEM-Medium, supplementiert mit 525 µg/ml ZeocinTM (Phleomycin von *Streptomyces verticillus*; Invitrogen BV, Niederlande). Die Zellen wurden zweimal wöchentlich mit frischem Selektionsmedium versetzt. Nach ca. 4 Wochen konnten Zellfoci, die Zellklone darstellten, identifiziert werden. Diese Kolonien wurden einzeln abgenommen, in eine 24-Loch-Platte (Flachboden, Nunc, Wiesbaden) in Zellkulturmedium ohne Antibiotikumssupplement überführt. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Erlangten die Zellen eine Konfluenz von ca. 90 %, wurden sie in entsprechend größere Zellkulturgefäße expandiert.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung zellspezifischer retroviraler Vektoren, umfassend die folgenden Schritte:
 - a) Immunisieren eines Säugetiers mit einer oder mehreren Zellpopulation(en),
 - b) Isolieren von RNA aus dem immunisierten Säugetier, umfassend die B-Zell-RNA,
 - c) Herstellen von cDNA-Abschnitte der variablen Regionen der schweren und leichten Kette der Immunglobuline aus der isolierten RNA mittels RT-PCR mit Primern für die schwere und leichte Kette der Immunglobuline, wobei die Primer die Nukleinsäuresequenz für einen Oligopeptidlinker umfassen,
 - d) Ligieren der cDNA-Abschnitte zu scFv-cDNAs,
 - e) Ligieren der scFv-cDNAs in einen Phagemid-Vektor und Transformieren eines Wirtsbakteriums mit dem Phagemid-Vektor,
 - f) Isolieren von Phagen, die an die in Schritt a) verwendete(n) Zellpopulation(en) binden, durch Selektion,
 - g) Isolieren von zellspezifischen Phagen aus den in Schritt f) erhaltenen Phagen, die nur an die in Schritt a) verwendete(n) Zellpopulation(en) binden, durch Selektion,
 - h) Ausschneiden der scFv-codierenden DNA-Fragmente aus den in Schritt g) erhaltenen zellspezifischen Phagen und Ligieren in einen psi-negativen retroviralen Env-Expressionsvektor,
 - i) Transformieren des erhaltenen Env-scFv-Expressionsvektors in eine Verpackungszelle, und
 - j) Isolieren der von der Verpackungszelle sezernierten retroviralen Vektoren.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die in Schritt g) erhaltenen zellspezifischen Phagen vereinzelt werden
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Schritte f) und/oder g) mindestens einmal wiederholt werden.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, weiter umfassend den Schritt:

k) Isolieren der von der Verpackungszelle sezernierten retroviren Vektoren, die die Zellen der Zellpopulation(en) transduzieren durch Selektion.

- 5 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Säugetier ausgewählt ist aus der Gruppe Maus, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen, Ziege oder Schaf.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Zellpopulation(en) ausgewählt ist aus der Gruppe Mensch, Maus, Ratte, Schaf, Rind oder Schwein.
- 10 7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die Zellpopulation(en) ausgewählt ist (sind) aus der Gruppe, umfassend T-Zellen, Epithelzellen, Muskelzellen, hämatopoietische Zellen, Stammzellen, neurale Zellen, Karzinomzellen oder Leberzellen.
- 15 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das env-Gen des psi-negativen retroviralen Env-Expressionsvektors vom Milznekrosevirus (SNV) stammt.
9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei der Expressionsvektor der Vektor mit der Bezeichnung pTC53 ist.
- 20 10. Retrovirale Vektoren, erhältlich nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9.
11. Verwendung der retroviralen Vektoren nach Anspruch 10 als Arzneimittel.
- 25 12. Verwendung des Vektors nach Anspruch 10 zur Herstellung eines Arzneimittels zur somatischen Gentherapie, Impftherapie oder Diagnostik.
13. Verwendung des Vektors nach Anspruch 10 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Therapie der Cystischen Fibrose, des ADA-Mangels, der chronischen Granulomatose oder der HIV-1 Infektion.
- 30 14. Retrovirale Verpackungszelle zur Gewinnung der retroviralen Vektoren nach Anspruch 10, transformiert sowohl mit einem oder mehreren psi-negativen

Expressionskonstrukt(en), die die gag-, pol- und/oder env-Genprodukte exprimieren, als auch mit einem psi-negativen Env-scFv-Expressionskonstrukt nach Anspruch 1 h).

- 5 15. Retrovirale Verpackungszelle nach Anspruch 14, ferner umfassend ein psi-positives Expressionskonstrukt, umfassend ein Nukleinsäurefragment, das in die durch den retroviralen Vektor zu transduzierende Zelle eingeführt werden soll.
- 10 16. Retrovirale Verpackungszelle nach Anspruch 15, wobei das Nukleinsäurefragment ein therapeutisches Gen oder dessen DNA-Fragment und/oder ein Reporter-gen oder ein Resistenzgen umfaßt.
- 15 17. Retrovirale Verpackungszelle nach Anspruch 16, wobei das therapeutische Gen oder dessen Nukleinsäurefragment das CFTR-, phox91-, ADA-, IL-16-, p53- oder revM10-Gen oder ein oder mehrere Impfgene z. B. rekombinantes gp120 und IL-16 umfaßt.
18. Retrovirale Verpackungszelle nach Anspruch 16, wobei das Reporter-gen β -Galaktosidase, "Green Fluorescent Protein", Luciferase und das Resistenzgen Neomycin umfaßt.

Transduktion von T-Zellen mit [SNV-scFv-Env]-Vektoren

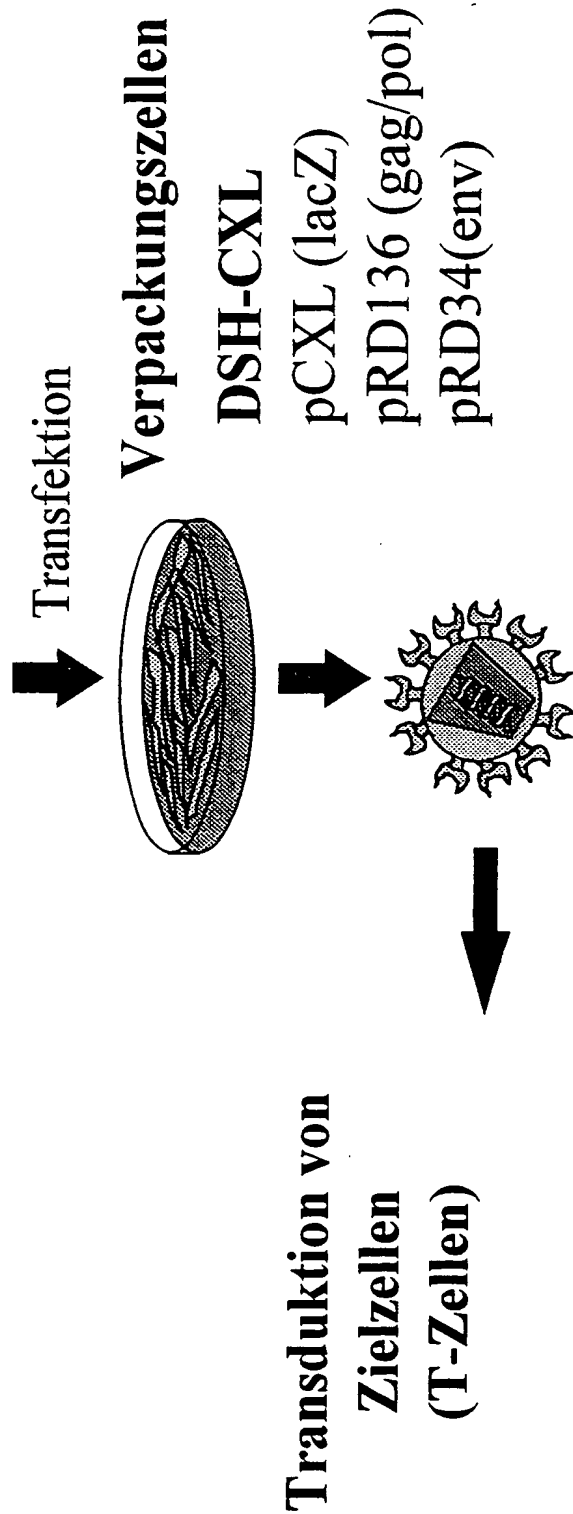
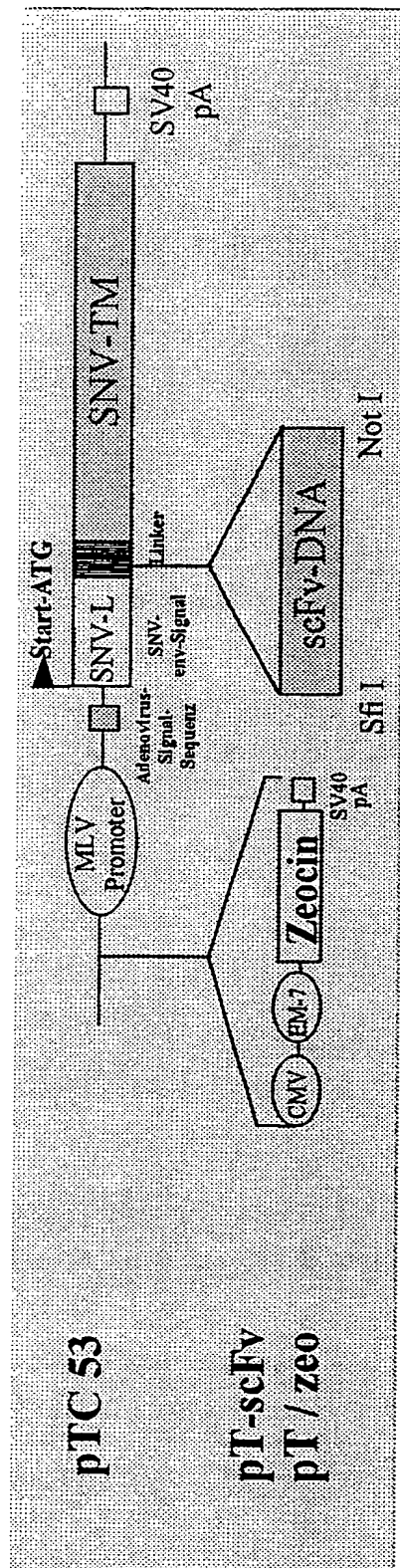


Abb. 1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Herstellen einer SNV-scFv-Env Vektor-Bibliothek

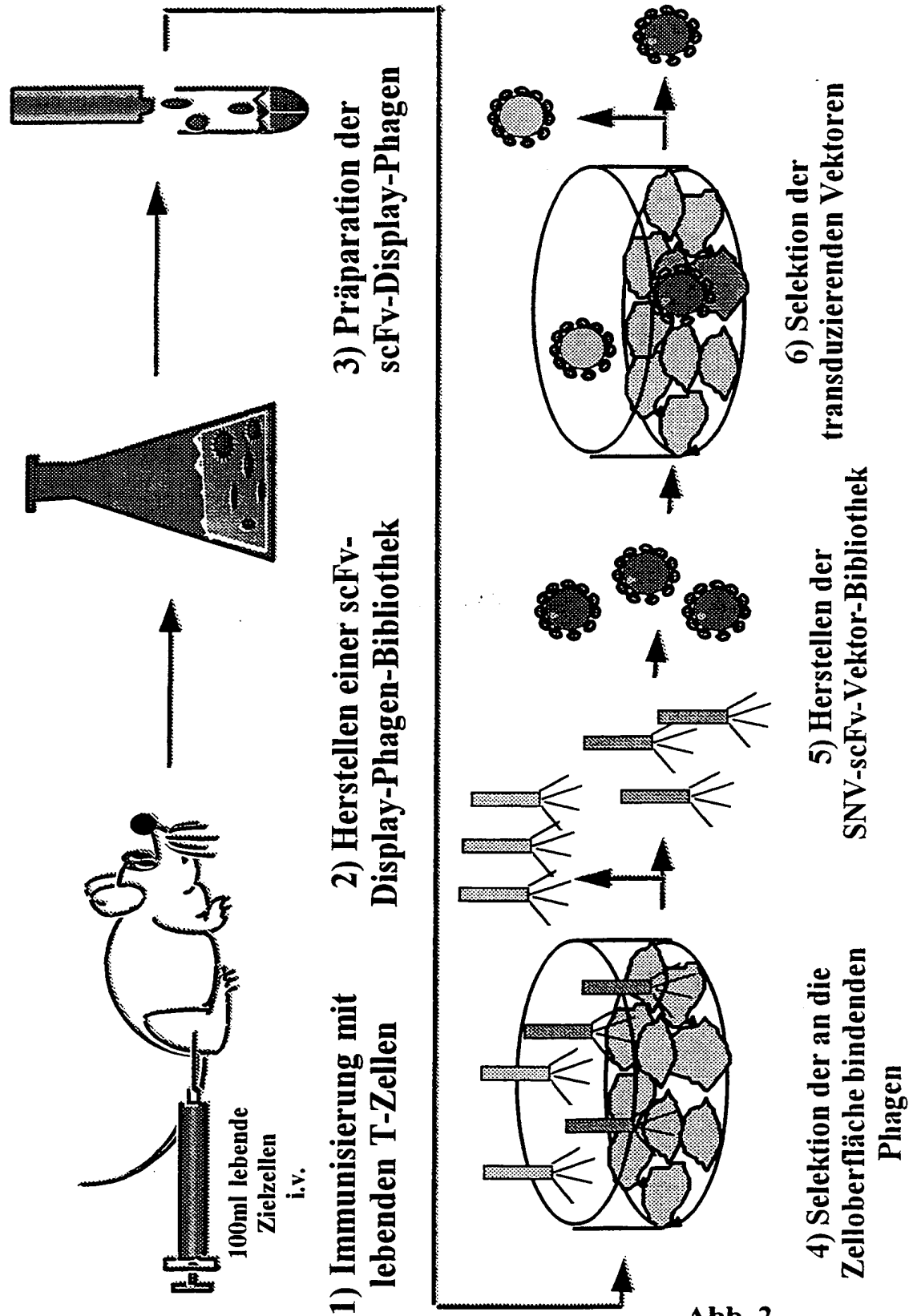


Abb. 2

THIS PAGE BLANK (USPTO)

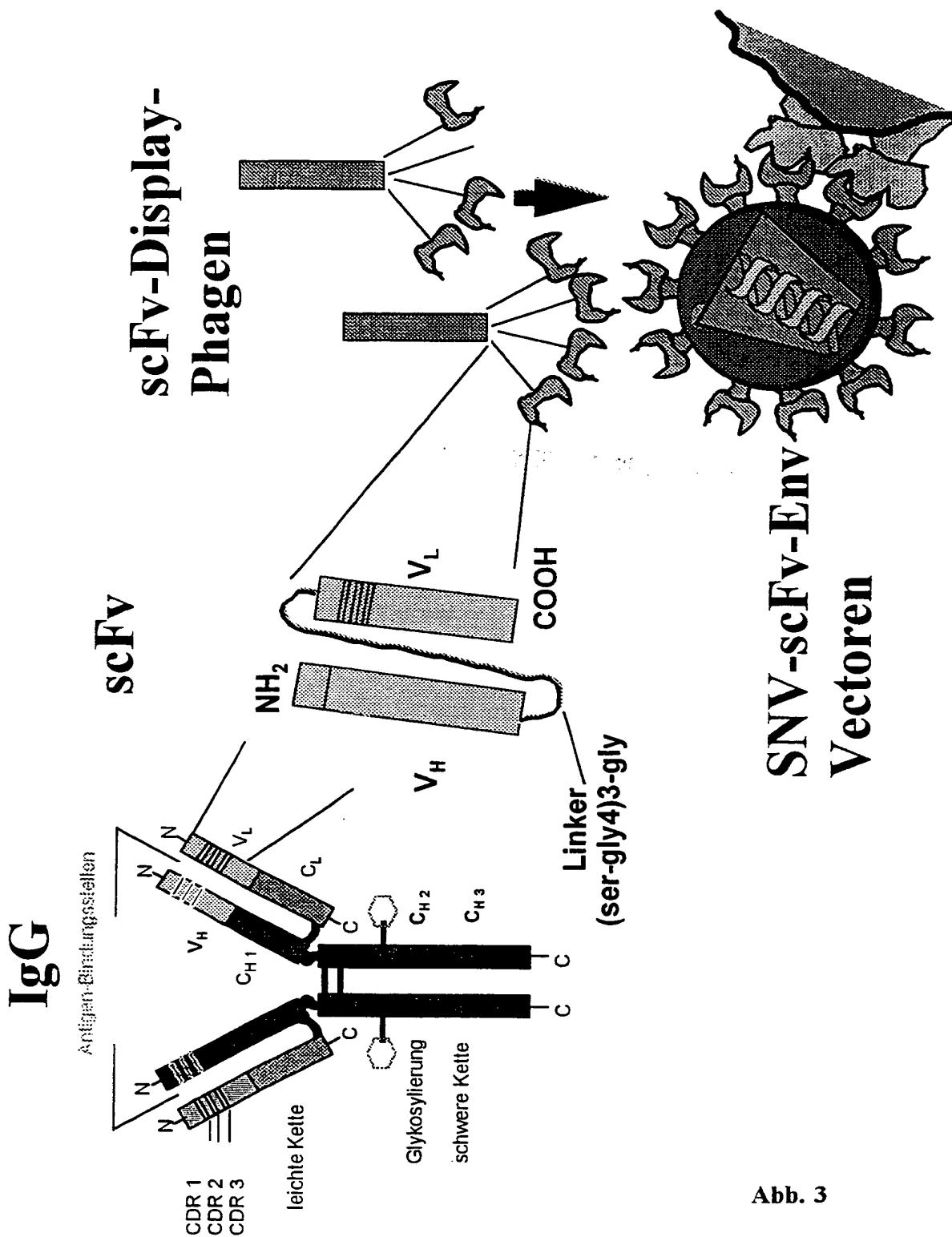


Abb. 3

THIS PAGE BLANK (USPTO)

pTC53.SEQ [1 to 4776] -> Genes

DNA sequence 4776 b.p. GAATTCCTCCGTAC ... ACGACGGCCAGT linear

```

1 GAATTCCTCCGTACGAGCCATAGATATAAATAAAGATTATTATTAGTCTCCAGAAAAAGGGGGA ATG AAA GAC CCC ACC TGT AGG TTT GGC 90
1 M K D P T C R F G 9
91 AAG CTA OCT TAA GTAACGCCATTTTGCAGGC ATG GAA AAA TAC ATA ACT GAG AAT AGA GAA GTT CAG ATC AAG GTC AGG 170
10 K L A * M E K Y I T E N R E V Q I K V R 16
171 AAC AGA TGG AAC AGC TGA AT ATG GGC CAA ACA GGA TAT CTG TGG TAA GCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGACAG ATG 253
17 N R W N S * M G Q T G Y L W * M 1
254 GAA CAG CTG AAT ATG GGC CAA ACA GGA TAT CTG TGG TAA GCAGTTCTGCCCCGGCTCAGGGCCAAGACAG ATG GTC CCC 334
2 E Q L N M G Q T G Y L W * M V P 3
335 AGA TGC GGT CCA GGC CTC AGC AGT TTC AGAACCATCAG ATG TTT CCA GGG TGC CCC AAG GAC CTG AAA TGA CCGT 412
4 R C G P A L S S F * M F P G C P K D L K * 11
413 GTCCCTTATTGAACATAACCAATCAGTTGCTTCTGCTTCTGTTTCCGGGGCTTCTGCTCCCGAGCTCAATAAAGAGCCCAACCCCTCACTCGGG 512
513 CGCCAGTCTCCGAGTTCAGTCTGAGTCCGCCGGTGGGGGAGCTCCCTGTTTGGCTCCGGGTGAAGACAAACTCTTCCAGTACTCTTGAT 612
613 CGGAACCCGTCGGGCTCCGAACCGTACTCCGCCACCGGGAAGCTGAGGAGTCCGATCGACCGATCGGAAACCTCTCGAGAAAGCGCTCAACCA 712
713 CTCACAGTCCCAAGGTAGCTGAGCACCGTCCCGGGGGGACCGGTGGGGTGGGGTCTTCTGCGGAGTCTCTG ATG ATG TAA TTAAG 808
1 M H * 3
809 TAGCCGCTCTTGAAGACCCG ATG GTC GAG GTG AGG TGT GGC AGG CTT GAG ATC TGG CCA TAC ACT TGA GTGACA ATG ACA 888
1 M V E V R C G R L E I W P Y T * M T 2
889 TCC ACT TTG CCT TTC CCA CAG GTG TCC ACT CCC AGG TCC AAC CGG ATC CGA OCT CCA CCG CGG TAA AGGTGCT 965
3 S T L P F S P Q V S T P R S N R I R A P P R * 25
966 GGAAGACCCGTCGGGCTCCGAACCGTACTCCGCCACCGGGAAGCTGAGGAGTCCGATCGACCGATCGGAAACCTCTCGAGAAAGCGCTCAACCA 1054
1 M D C L T N L R S A 10
1055 GAG GGT AAA GTT GAC CAG GGC AGC AAA ATC CTA ATT CTC CTT GTG OCT TGG TGG GGG TTT GGG ACC ACT GGC GAA 1129
11 E G K V D Q A S K I L I L L V A W W G F T T A E 35
1130 GTT TGG ACT GGC GGC TCC GGC GGC GGT GGT TCT GGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT TCT GGT GGT GGT TCT 1204
36 V S T A G S G G G G S G G G S G G G S G G G S G G G S G G G S G G G S 60
1205 GGC GGC AGC CCA GTC CAG TTT ATC CCC CTG CTT GTG GGT CTA GGG ATT TCA GGG OCT ACA CTT OCT GGT GGA AGC 1279
61 Q A S P V G T I P L V G L G I S G A T L A G G T 85
1280 GGC CTT GGC GTC TCC GTT CAC ACT TAT CAC AAG CTC TCT AAT CAA TTG ATT GAA GAT GTC CAG GCT CTT TCA GGG 1354
86 G L G V S V H T Y H K L S N Q L I E D V Q A L S G 110
1355 ACC ATC AAT GAC CTA CAG GAC CAG ATT GAC TCC CTG GCT GAG GTT GTC TTA CAA AAT AGA AGA GGG TTA GAC CTA 1429
111 T I N D L Q D Q I D S L A E V V L Q N R R G L D L 135
1430 TTG ACT GGC GAA CAA GGA GGA ATA TGT CTC CCA CTC CAG GAG AAG TGT TGT TTT TAC GCT AAC AAG TGG GGT ATC 1504
136 L T A E G G L A L Q E K C C F Y A N K S G I 160
1505 GTA CGT GAC AAG ATC CGA AAA CTC CAA GAG GAC CTT ATC GAG AGA AAA CGT GCA CTG TAC GAC AAC CCC CTG TGG 1579
161 V R D K I R K L Q E D L I E R K R A L Y D N P L W 185
1580 AGC GGC TTG AAC GGC TTC CTT CCA TAT TTG CTA CCC TTG TTA GGC CCC CTG TTT GGG CTC ATA TTG TTC CTG ACC 1654
186 S G L N G F L P Y L P L L G P L F G L I L F L T 210
1655 CTC GGC CCG TGC ATT ATG AAG ACC CTG ACT CCG ATT ATA CAT GAC AAA ATT CAG OCA GTA AAA TCC TAG CACTAGTC 1731
211 L G P C I M K T L T R I I H D K I Q A V K S * 233
1732 CCACAGTACAGCCACTCCCAACAGAG ATG GAT ACC CTA GGC GTC CGA TGG TCT AAG AAT TCT CGA GTC TAA GATGATCGAAT 1815
1 M D T L G V R W S K N S R V * 15
1816 TCTAGGTCA ATG ATT TGA CCAGA ATG TAC AAG ACC AGT GGG GAA TGT GGG AGG GGC TTA CGA AGG CCT TAA GTGACTA 1894
1 M I * M Y K S S G E C G R G L R R P * 16
1895 GTTACCCGATCCAGAC ATG ATA AGA TAC ATT GAT GAG TTT GGA CAA ACC ACA ACT AGA ATG CAG TGA AAAAA ATG CTT 1972
1 M I R Y I D E F G Q T T T R H Q * M L 2
1973 TAT TTG TGA AATTGTTG ATG CTA TTG CTT TAT TTG TAA CCATTATAGCTGCATTAACAAAGTACAAACAACAAATTGCATTATTT 2060
3 Y L * M L L Y L * 7
2061 ATG TTT CAG GTT CAG GGC GAG GTG TGG GAG GTT TTT TAA ACCAAGTAAACCTCTACAAATCAAGCTGGGCAAGCTAGATCTAGCTT 2147
1 M F Q V Q G E V W E V F * 13
2148 GCGTAATC ATG GTC ATA OCT GTT TCC TGT GTG AAA TTG TTA TCC GCT CAC AAT TCC ACA CAA CAT ACG AGC CCG 2222
1 M V I A V S C V K L L S A H N S T Q H T S R 22
2223 AAG CAT AAA GTG TAA AGCCTGGGGTCCCTA ATG AGT GAG CTA ACT CAC AAT AAT TGC GTT CCG CTC ACT GGC CCG TTT 2300
23 K H K V * M S E L T H I N C V A L T A R F 16

```

A5b. 4 A

THIS PAGE BLANK (USPTO)

2301 CCA GTC GGG AAA CCT GTC GTG CCA GCT GCA TTA ATG AAT CGG CCA ACG CGC GGG GAG ACG CGG TTT GCG TAT TGG 2375
17 P V G K P V V P A A L M N R P T R G E R R F A Y W 41

2376 GCG CTC TTC CGC TTC CTC GCT CAC TGA CTGCTGGGCTGGGTGGTGGGCTGGGCGAGCGGTATCAGCTCACTCAAAAGCGGTAAACGG 2466
42 A L F R F L A H * 50

2467 TTATCCACAGAATCAGGGGATAACGACGAAAGAAC ATG TGA GCAAAAGGCCAGCAAAAGGCCAGGAACGTTAAAGAGCCCGGTGCTGGCGTTT 2563
1 M * 2

2564 TCATAGGCTCGGCCCCCTGACGAGCATCACAAAATCGAGCTCAAGTCAGAGGTGGCGAAACCGACAGGACTATAAGATACAGCGGCTTTCCCC 2663

2664 TGGAGCTCCCTCGTGGGCTCTCTCTGTTCGACCCCTGGCGCTTACCGGATACCTGTCCGCGTTCTCTCCCTTCGGGAAGCGTGGCGCTTTTCA ATG 2759
1 M 1

2760 CTC ACG CTG TAG GTATCTCAGTTCCGTGTAGGTGGTGGCTCCAGCTGGGCTGTGTGACGAAACCCCGTTACGCCCCGACCCCTGGCGCTTATC 2855
2 L T L * 5

2856 CGGTAACTATCTGTTGAGTCCAAACCGGTAAAGACAGGACTTATCGCCACTGGCAGACCGCACTGGTAACAGGATTAGCAGAGCGAGGT ATG TAG GC 2952
1 M * 2

2953 GTGTGACAGATTTCTTGAAGTGGTGGCTAACTACGGCTACACTAGAGGACAGTATTTGGTATCTGGCTCTGGTGAAGCCAGTTACCTTCGGAAAA 3052

3053 GAGTTGGTAGCTCTTGTATCGGCAAAACCAACCGCTGGTAGCGGTGGTGTGTGTTCGAAACAGCAGATTACCGCGAAGAAAAAGGATCTCAAGA 3152

3153 AGATCTTTGATCTTTTCTACCGGGTCTGAGGCTCAGTGGACGAAACTCACTTAAAGGATTTGGTTC ATG AGA TTA TCA AAA AGG ATC 3243
1 M R L S K R I 7

3244 TTC ACC TAG ATCTTTTAAATZAAA ATG AAG TTT TAA ATCAATCTAAGTATAT ATG AGT AAA CTT GGT CTG ACA GTT ACC 3325
8 F T * M K F * H S K L G L T V T 9

3326 AAT GCT TAA TCAGTGAAGCACTATCTCAGGATCTGTCTATTTCTTCATCCATAGTTCCTGACTCCCGGTGGTGTAGATTAAGATACGGA 3422
10 N A * 12

3423 GGGCTTACCATCTGGCCCCAGTGTGCA ATG ATA CCG CGA GAC CCA CGC TCA CCG GCT CCA GAT TTA TCA GCA ATA AAC CAG 3504
1 M I P R D P R S P A P D L S A I N Q 18

3505 CCA GCG GGA ACG GCG GAG CGC AGA AGT GGT OCT GCA ACT TTA TCC GCG TCC ATC CAG TCT ATT AAT TGT TCC CGG 3579
19 P A G R A E R R S G P A T L S A S I Q S I N C C R 43

3580 GAA OCT AGA GTA AGT AGT TCG CCA GTT AAT AGT TTG CCG AAC GTT GTT GCG ATT OCT ACA GCG ATC GTG GTG TCA 3654
44 E A R V S S S P V N S L R N V V A I A T G I V V S 68

3655 CCG TCG TCG TTT GGT ATG GCT TCA TTC AGC TCC GGT TCC CAA CGA TCA AGG CGA GTT ACA TGA TCCCC ATG TTG 3729
69 R S S F G H A S F S S G S Q R S R R V T * M L 2

3730 TCC AAA AAA GCG GTT AGC TCC TTC GGT OCT CCG ATC GTT GTC AGA AGT AAG TTG GCG CCA GTG TTA TCA CTC ATG 3804
3 C K K A V S S F G P P I V V R S K L A A V L S L M 27

3805 GTT ATG CCA CCA CTG CAT AAT TCT CTT ACT GTC ATG CCA TCC GTA AGA TGC TTT TCT GTG ACT GGT GAG TAC TCA 3879
28 V M A A L H N S L T V M P S V R C F S V T G E Y S 52

3880 ACC AAG TCA TTT TGA GAGTGTGT ATG CCG CGA CGG AGT TCC TCT TCC CCG GCG TCA ATA CCG GAT AAT ACC GCG 3954
53 T K S F * M R R P S C P A S I R D N T A 17

3955 CCA CAT AGC AGA ACT TTA AAA GTG CTC ATC ATT GGA AAA CGT TCT TCG GCG CGA AAA CTC TCA AGG ATC TTA CCG 4029
18 P H S R T L K V L I I G K R S S G R K L S R I L P 42

4030 CTG TTG AGA TCC AGT TCG ATG TAA CCGACTGGTGCACCACTGATCTTACGATCTTTACTTTACACAGCGTTTCTGGGTGAGCAAAAC 4121
43 L L R S S S M * 50

4122 AGGAAGCAAA ATG CCG CAA AAA AGG GAA TAA GGGGACACCGAA ATG TTG AAT ACT CAT ACT CTT OCT TTT TCA ATA 4199
1 M P Q K R E * M L N T H T L P F S I 11

4200 TTA TTG AAG CAT TTA TCA GCG TTA TTG TCT CAT GAG CCG ATA CAT ATT TGA ATG TAT TTA GAA AAA TAA ACAATA 4275
12 L L K H L S G L L S H E R I H I * M Y L E K * 6

4276 GGGGTTCCCGCACATTTCGCGAAAAAGTGGCACTGACGTCTAAGAAACCATTAATATC ATG ACA TTA ACC TAT AAA AAT AGG CGT ATC 4365
1 M T L T Y K N R R I 10

4366 ACG AGG CCG TTT GGT CTC GCG GGT TTC GGT GAT GAC GGT GAA AAC CTC TGA CAC ATG CAG CTC CCG GAG ACG GTC 4440
11 T R P F R L A R F G D G E N L * M Q L P E T V 7

4441 ACA GCT TGT CTG TAA GCGG ATG CCG GGA GCA GAC AAG CCG GTC AGG GCG CGT CAG CCG GTG TTG GCG GGT GTC GCG 4516
8 T A C L * M P G A D K P V R A R Q R V L A G V G 19

4517 GCT GCG TTA ACT ATG CCG CAT CAG AGC AGA TTG TAC TGA GAGTCCACCAT ATG CCG TGT GAA ATA CAG AGA TGC 4593
20 A G L T M R H Q S R L Y * M R C E I P H R C 9

4594 GTA AGG AGA AAA TAC CGC ATC AGG CCG CAT TCG CCA TTC AGG CTG CCG AAC TGT TGG GAA GCG CGA TCG GTG CCG 4668
10 V R R K Y R I R R H S P F R L R N C W E G R S V R 34

4669 GCG TCT TCG CTA TTA CCG CAG CTG GCG AAA GCG GGA TGT GCT CCA AGG CGA TTA AGT TGG GTA ACG CCA GCG TTT 4743
35 A S L R Q L A K G G C A A R R L S W V T P G F 59

4744 TCC CAG TCA CGA CGT TGT AAA ACG ACG GCG AGT 4776
60 S Q S R R C K T T A S 70

Abb. 4 B

THIS PAGE BLANK (USPTO)

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

(A) NAME: Bundesrepublik Deutschland letztvertreten durch
den Präsidenten des Paul-Ehrlich-Instituts
(B) STRASSE: Paul-Ehrlich-Str. 51-59
(C) ORT: Langen
(E) LAND: Deutschland
(F) POSTLEITZAHL: 63225

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Zellspezifische retrovirale Vektoren
mit Antikörperdomänen und Verfahren zu ihrer Herstellung für den selektiven
Gentransfer

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 32

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

(A) DATENTRÄGER: Floppy disk
(B) COMPUTER: IBM PC compatible
(C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
(D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(v) DATEN DER FRÜHEREN ANMELDUNG:

ANMELDENUMMER: DE 197 52 854.6
ANMELDETAG: 28-11-1997

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 4776 Basenpaare
(B) ART: Nucleotid
(C) STRANGFORM: Doppelstrang
(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GAATTCCTCGT ACGAGCCATA GATAAAATAA AAGATTTTAT TTAGTCTCCA GAAAAGGGG	60
GGAATGAAAG ACCCCACCTG TAGGTTTGGC AAGCTAGCTT AAGTAACGCC ATTTTGCAAG	120
GCATGGAAAA ATACATAACT GAGAATAGAG AAGTTCAGAT CAAGGTCAGG AACAGATGGA	180
ACAGCTGAAT ATGGGCCAAA CAGGATATCT GTGGTAAGCA GTTCCTGCCC CGGCTCAGGG	240
CCAAGAACAG ATGGAACAGC TGAATATGGG CCAAACAGGA TATCTGTGGT AAGCAGTTCC	300
TGCCCCGGCT CAGGGCCAAG AACAGATGGT CCCAGATGC GGTCCAGCCC TCAGCAGTTT	360
CTAGAGAACC ATCAGATGTT TCCAGGGTGC CCCAAGGACC TGAAATGACC CTGTGCCTTA	420
TTTGAATAA CCAATCAGTT CGCTTCTCGC TTCTGTTCGC GCGCTTCTGC TCCCCGAGCT	480

THIS PAGE BLANK (USPTO)

	CAATAAAAGA	GCCCACAACC	CCTCACTCGG	GGCGCCAGTC	CTCCGATTGA	CTGAGTCGCC	540
5	CGGGTGGGGG	AGCTCGCTGT	TGGGCTCGCG	GTTGAGGACA	AACTCTTCGC	GGTCTTTCCA	600
	GTACTCTTGG	ATCGGAAACC	CGTCGGCCTC	CGAACGGTAC	TCCGCCACCG	AGGGACCTGA	660
	GCGAGTCCGC	ATCGACCGGA	TCGGAAAACC	TCTCGAGAAA	GGCGTCTAAC	CAGTCACAGT	720
10	CGCAAGGTAG	GCTGAGCACC	GTGGCCGGGC	GGCACGGGTG	GCGGTCGGGG	TTGTTTCTGG	780
	CGGAGGTGCT	GCTGATGATG	TAATTAAGTA	GGCGGTCTTG	AGACGGCGAT	GGTCGAGGTG	840
15	AGGTGTGGCA	GGCTTGAGAT	CTGGCCATAC	ACTTGAGTGA	CAATGACATC	CACTTTGCCT	900
	TTCTCTCCAC	AGGTGTCCAC	TCCCAGGTCC	AACCGGATCC	GAGCTCCACC	GCGGTAAAGG	960
	TCGCTGGGAA	GACCCCGTGG	ATCCACCACT	CTCGACTCAA	GAAAGCTCCT	GACAACCAAG	1020
20	AAGAATGGAC	TGTCTCACCA	ACCTCCGATC	CGCTGAGGGT	AAAGTTGACC	AGGCGAGCAA	1080
	AATCCTAATT	CTCCTTGTGG	CTTGGTGGGG	GTTTGGGACC	ACTGCCGAAG	TTTCGACTGC	1140
25	CGGCTCCGGG	GGCGGTGGTT	CTGGTGGTGG	TTCTGGTGGT	GGTGGTTCTG	GTGGTGGTGG	1200
	TTCTGGCGCC	AGCCCAGTCC	AGTTTATCCC	CCTGCTTGTG	GGTCTAGGGA	TTTCAGGGGC	1260
	TACACTTGCT	GGTGGAACGG	GGCTTGGGGT	CTCCGTTCAC	ACTTATCACA	AGCTCTCTAA	1320
30	TCAATTGATT	GAAGATGTCC	AGGCTCTTTC	AGGGACCATC	AATGACCTAC	AGGACCAGAT	1380
	TGACTCCCTG	GCTGAGGTTG	TCTTACAAAA	TAGAAGAGGG	TTAGACCTAT	TGACTGCCGA	1440
35	ACAAGGAGGA	ATATGTCTCG	CACTCCAGGA	GAAGTGTTGT	TTTTACGCTA	ACAAGTCGGG	1500
	TATCGTACGT	GACAAGATCC	GAAAACTCCA	AGAGGACCTT	ATCGAGAGAA	AACGTGCACT	1560
	GTACGACAAC	CCCCTGTGGA	GCGGCTTGAA	CGGCTTCCTT	CCATATTTGC	TACCCTTGTT	1620
40	AGGCCCCCTG	TTTGGGCTCA	TATTGTTCTT	GACCCTCGGC	CCGTGCATTA	TGAAGACCCT	1680
	GACTCGCATT	ATACATGACA	AAATTCAGGC	AGTAAATCC	TAGCACTAGT	CCCACAGTAC	1740
45	AAGCCACTCC	CAACAGAGAT	GGATACCCTA	GGGGTCCGAT	GGTCTAAGAA	TTCTCGAGTC	1800
	TAAGATCGAT	CGAATTCCTA	GGTCAATGAT	TTGACCAGAA	TGTACAAGAG	CAGTGGGGAA	1860
	TGTGGGAGGG	GCTTACGAAG	GCCTTAAGTG	ACTAGGTACC	CGATCCAGAC	ATGATAAGAT	1920
50	ACATTGATGA	GTTTGGACAA	ACCACAATA	GAATGCAGTG	AAAAAAATGC	TTTATTTGTG	1980
	AAATTTGTGA	TGCTATTGCT	TTATTTGTAA	CCATTATAAG	CTGCAATAAA	CAAGTTAACA	2040
55	ACAACAATTG	CATTCATTTT	ATGTTTCAGG	TTCAGGGGGA	GGTGTGGGAG	GTTTTTTAAA	2100
	GCAAGTAAAA	CCTCTACAAA	TCAAGCTGGG	CAAGCTAGAT	CTAGCTTGGC	GTAATCATGG	2160
	TCATAGCTGT	TTCCTGTGTG	AAATTGTTAT	CCGCTCACAA	TTCCACACAA	CATACGAGCC	2220

THIS PAGE BLANK (USPTO)

	GGAAGCATAA	AGTGTAAGC	CTGGGGTGCC	TAATGAGTGA	GCTAACTCAC	ATTAATTGCG	2280
	TTGCGCTCAC	TGCCCCGCTTT	CCAGTCGGGA	AACCTGTCGT	GCCAGCTGCA	TTAATGAATC	2340
5	GGCCAACGCG	CGGGGAGAGG	CGGTTTGCGT	ATTGGGCGCT	CTTCCGCTTC	CTCGCTCACT	2400
	GACTCGCTGC	GCTCGGTCGT	TCGGCTGCGG	CGAGCGGTAT	CAGCTCACTC	AAAGGCGGTA	2460
10	ATACGGTTAT	CCACAGAATC	AGGGGATAAC	GCAGGAAAGA	ACATGTGAGC	AAAAGGCCAG	2520
	CAAAAGGCCA	GGAACCGTAA	AAAGGCCGCG	TTGCTGGCGT	TTTTCCATAG	GCTCCGCCCC	2580
	CCTGACGAGC	ATCACAAAAA	TCGACGCTCA	AGTCAGAGGT	GGCGAAACCC	GACAGGACTA	2640
15	TAAAGATACC	AGGCGTTTCC	CCCTGGAAGC	TCCCTCGTGC	GCTCTCCTGT	TCCGACCCTG	2700
	CCGCTTACCG	GATACCTGTC	CGCCTTTCTC	CCTTCGGGAA	GCGTGGCGCT	TTCTCAATGC	2760
20	TCACGCTGTA	GGTATCTCAG	TTCGGTGTAG	GTCGTTGCGT	CCAAGCTGGG	CTGTGTGCAC	2820
	GAACCCCCCG	TTCAGCCCGA	CCGCTGCGCC	TTATCCGGTA	ACTATCGTCT	TGAGTCCAAC	2880
	CCGGTAAGAC	ACGACTTATC	GCCACTGGCA	GCAGCCACTG	GTAACAGGAT	TAGCAGAGCG	2940
25	AGGTATGTAG	GCGGTGCTAC	AGAGTTCTTG	AAGTGGTGGC	CTAACTACGG	CTACACTAGA	3000
	AGGACAGTAT	TTGGTATCTG	CGCTCTGCTG	AAGCCAGTTA	CCTTCGGAAA	AAGAGTTGGT	3060
30	AGCTCTTGAT	CCGGCAAACA	AACCACCGCT	GGTAGCGGTG	GTTTTTTTGT	TTGCAAGCAG	3120
	CAGATTACGC	GCAGAAAAAA	AGGATCTCAA	GAAGATCCTT	TGATCTTTTC	TACGGGGTCT	3180
	GACGCTCAGT	GGAACGAAAA	CTCACGTTAA	GGGATTTTGG	TCATGAGATT	ATCAAAAAGG	3240
35	ATCTTCACCT	AGATCCTTTT	AAATTAAAAA	TGAAGTTTTA	AATCAATCTA	AAGTATATAT	3300
	GAGTAAACTT	GGTCTGACAG	TTACCAATGC	TTAATCAGTG	AGGCACCTAT	CTCAGCGATC	3360
40	TGTCTATTTT	GTTTCATCCAT	AGTTGCCTGA	CTCCCCGTCG	TGTAGATAAC	TACGATACGG	3420
	GAGGGCTTAC	CATCTGGCCC	CAGTGCTGCA	ATGATACCGC	GAGACCCACG	CTCACCGGCT	3480
	CCAGATTTAT	CAGCAATAAA	CCAGCCAGCC	GGAAGGGCCG	AGCGCAGAAG	TGGTCCTGCA	3540
45	ACTTTATCCG	CCTCCATCCA	GTCTATTAAT	TGTTGCCGGG	AAGCTAGAGT	AAGTAGTTCG	3600
	CCAGTTAATA	GTTTGCGCAA	CGTTGTTGCC	ATTGCTACAG	GCATCGTGGT	GTCACGCTCG	3660
50	TCGTTTGGTA	TGGCTTCATT	CAGCTCCGGT	TCCCAACGAT	CAAGGCGAGT	TACATGATCC	3720
	CCCATGTTGT	GCAAAAAAGC	GGTTAGCTCC	TTCGGTCCTC	CGATCGTTGT	CAGAAGTAAG	3780
	TTGGCCGCAG	TGTTATCACT	CATGGTTATG	GCAGCACTGC	ATAATTCTCT	TACTGTCATG	3840
55	CCATCCGTAA	GATGCTTTTC	TGTGACTGGT	GAGTACTCAA	CCAAGTCATT	CTGAGAATAG	3900
	TGTATGCGGC	GACCGAGTTG	CTCTTGCCCG	GCGTCAATAC	GGGATAATAC	CGCGCCACAT	3960
	AGCAGAACTT	TAAAAGTGCT	CATCATTGGA	AAACGTTCTT	CGGGGCGAAA	ACTCTCAAGG	4020

THIS PAGE BLANK (USPTO)

5 ATCTTACCGC TGTTGAGATC CAGTTCGATG TAACCCACTC GTGCACCCAA CTGATCTTCA 4080
 GCATCTTTTA CTTTCACCAG CGTTTCTGGG TGAGCAAAAA CAGGAAGGCA AAATGCCGCA 4140
 AAAAAGGGAA TAAGGGCGAC ACGGAAATGT TGAATACTCA TACTCTTCCT TTTTCAATAT 4200
 TATTGAAGCA TTTATCAGGG TTATTGTCTC ATGAGCGGAT ACATATTTGA ATGTATTTAG 4260
 10 AAAAATAAAC AAATAGGGGT TCCGCGCACA TTTCCCGAA AAGTGCCACC TGACGTCTAA 4320
 GAAACCATTA TTATCATGAC ATTAACCTAT AAAAATAGGC GTATCACGAG GCCCTTTTCGT 4380
 CTCGCGCGTT TCGGTGATGA CGGTGAAAAC CTCTGACACA TGCAGCTCCC GGAGACGGTC 4440
 15 ACAGCTTGTC TGTAAGCGGA TGCCGGGAGC AGACAAGCCC GTCAGGGCGC GTCAGCGGGT 4500
 GTTGGCGGGT GTCGGGGCTG GCTTAACTAT GCGGCATCAG AGCAGATTGT ACTGAGAGTG 4560
 20 CACCATATGC GGTGTGAAAT ACCGCACAGA TCGGTAAGGA GAAAATACCG CATCAGGCGC 4620
 CATTGCCCAT TCAGGCTGCG CAACTGTTGG GAAGGGCGAT CGGTGCGGGC CTCTTCGCTA 4680
 25 TTACGCCAGC TGGCGAAAGG GGGATGTGCT GCAAGGCGAT TAAGTTGGGT AACGCCAGGG 4740
 TTTTCCCAGT CACGACGTTG TAAAACGACG GCCAGT 4776

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 12 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

Met Lys Asp Pro Thr Cys Arg Phe Gly Lys Leu Ala
 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 21 Aminosäuren
- (B) ART: Aminosäure
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Met Glu Lys Tyr Ile Thr Glu Asn Arg Glu Val Gln Ile Lys Val Arg
 5 10 15

Asn Arg Trp Asn Ser
 20

THIS PAGE BLANK (USPTO,

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 8 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met Gly Gln Thr Gly Tyr Leu Trp

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 13 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Met Glu Gln Leu Asn Met Gly Gln Thr Gly Tyr Leu Trp

5

10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 12 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Met Val Pro Arg Cys Gly Pro Ala Leu Ser Ser Phe

5

10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 10 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Met Phe Pro Gly Cys Pro Lys Asp Leu Lys

5

10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 15 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Met Val Glu Val Arg Cys Gly Arg Leu Glu Ile Trp Pro Tyr Thr

5

10

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 24 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

THIS PAGE BLANK (USP10)

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(B) ART: Aminosäure

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEO ID NO: 10:

Met	Asp	Cys	Leu	Thr	Asn	Leu	Arg	Ser	Ala	Glu	Gly	Lys	Val	Asp	Gln	
				5					10							15
Ala	Ser	Lys	Ile	Leu	Ile	Leu	Leu	Val	Ala	Trp	Trp	Gly	Phe	Gly	Thr	
				20					25							30
Thr	Ala	Glu	Val	Ser	Thr	Ala	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	
				35					40							45
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Ala	Ser	Pro	
				50					55							60
Val	Gln	Phe	Ile	Pro	Leu	Leu	Val	Gly	Leu	Gly	Ile	Ser	Gly	Ala	Thr	
65					70					75						80
Leu	Ala	Gly	Gly	Thr	Gly	Leu	Gly	Val	Ser	Val	His	Thr	Tyr	His	Lys	
				85					90							95
Leu	Ser	Asn	Gln	Leu	Ile	Glu	Asp	Val	Gln	Ala	Leu	Ser	Gly	Thr	Ile	
				100					105							110
Asn	Asp	Leu	Gln	Asp	Gln	Ile	Asp	Ser	Leu	Ala	Glu	Val	Val	Leu	Gln	
				115					120							125
Asn	Arg	Arg	Gly	Leu	Asp	Leu	Leu	Thr	Ala	Glu	Gln	Gly	Gly	Ile	Cys	
130					135					140						
Leu	Ala	Leu	Gln	Glu	Lys	Cys	Cys	Phe	Tyr	Ala	Asn	Lys	Ser	Gly	Ile	
145					150					155						160
Val	Arg	Asp	Lys	Ile	Arg	Lys	Leu	Gln	Glu	Asp	Leu	Ile	Glu	Arg	Lys	
				165					170							175
Arg	Ala	Leu	Tyr	Asp	Asn	Pro	Leu	Trp	Ser	Gly	Leu	Asn	Gly	Phe	Leu	
				180					185							190
Pro	Tyr	Leu	Leu	Pro	Leu	Leu	Gly	Pro	Leu	Phe	Gly	Leu	Ile	Leu	Phe	
				195					200							205
Leu	Thr	Leu	Gly	Pro	Cys	Ile	Met	Lys	Thr	Leu	Thr	Arg	Ile	Ile	His	
				210					215							220
Asp	Lys	Ile	Gln	Ala	Val	Lys	Ser									
225					230											

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(B) ART: Aminosäure

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:

Met Asp Thr Leu Gly Val Arg Trp Ser Lys Asn Ser Arg Val
5 10

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Met Tyr Lys Ser Ser Gly Glu Cys Gly Arg Gly Leu Arg Arg Pro
5 10 15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 16 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

Met Ile Arg Tyr Ile Asp Glu Phe Gly Gln Thr Thr Thr Arg Met Gln
5 10 15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 14:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 4 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

Met Leu Tyr Leu

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 6 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

Met Leu Leu Leu Tyr Leu

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 12 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

Met Phe Gln Val Gln Gly Glu Val Trp Glu Val Phe
5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 26 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

Met Val Ile Ala Val Ser Cys Val Lys Leu Leu Ser Ala His Asn Ser
5 10 15
Thr Gln His Thr Ser Arg Lys His Lys Val
20 25

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 49 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

10 Met Ser Glu Leu Thr His Ile Asn Cys Val Ala Leu Thr Ala Arg Phe
 5 10 15
 Pro Val Gly Lys Pro Val Val Pro Ala Ala Leu Met Asn Arg Pro Thr
 20 25 30
 15 Arg Gly Glu Arg Arg Phe Ala Tyr Trp Ala Leu Phe Arg Phe Leu Ala
 35 40 45
 His

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 4 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

20
 25 Met Leu Thr Leu

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

30
 35 Met Arg Leu Ser Lys Arg Ile Phe Thr
 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 11 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

40
 45 Met Ser Lys Leu Gly Leu Thr Val Thr Asn Ala
 5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 88 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

50
 55 Met Ile Pro Arg Asp Pro Arg Ser Pro Ala Pro Asp Leu Ser Ala Ile
 5 10 15
 Asn Gln Pro Ala Gly Arg Ala Glu Arg Arg Ser Gly Pro Ala Thr Leu
 20 25 30
 Ser Ala Ser Ile Gln Ser Ile Asn Cys Cys Arg Glu Ala Arg Val Ser

THIS PAGE BLANK (USPTO)

35 40 45
 Ser Ser Pro Val Asn Ser Leu Arg Asn Val Val Ala Ile Ala Thr Gly
 50 55 60
 Ile Val Val Ser Arg Ser Ser Phe Gly Met Ala Ser Phe Ser Ser Gly
 5 65 70 75 80
 Ser Gln Arg Ser Arg Arg Val Thr
 85

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 24:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 56 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

Met Leu Cys Lys Lys Ala Val Ser Ser Phe Gly Pro Pro Ile Val Val
 5 10 15
 Arg Ser Lys Leu Ala Ala Val Leu Ser Leu Met Val Met Ala Ala Leu
 20 25 30
 His Asn Ser Leu Thr Val Met Pro Ser Val Arg Cys Phe Ser Val Thr
 35 40 45
 Gly Glu Tyr Ser Thr Lys Ser Phe
 50 55

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 25:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 49 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:

Met Arg Arg Pro Ser Cys Ser Cys Pro Ala Ser Ile Arg Asp Asn Thr
 5 10 15
 Ala Pro His Ser Arg Thr Leu Lys Val Leu Ile Ile Gly Lys Arg Ser
 20 25 30
 Ser Gly Arg Lys Leu Ser Arg Ile Leu Pro Leu Leu Arg Ser Ser Ser
 35 40 45
 Met

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 26:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 6 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26:

Met Pro Gln Lys Arg Glu
 5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 27:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 27 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27:

THIS PAGE BLANK (USPTO

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 32:

5 Met Arg Cys Glu Ile Pro His Arg Cys Val Arg Arg Lys Tyr Arg Ile
5 10 15
Arg Arg His Ser Pro Phe Arg Leu Arg Asn Cys Trp Glu Gly Arg Ser
20 25 30
Val Arg Ala Ser Ser Leu Leu Arg Gln Leu Ala Lys Gly Gly Cys Ala
35 40 45
10 Ala Arg Arg Leu Ser Trp Val Thr Pro Gly Phe Ser Gln Ser Arg Arg
45 50 55
Cys Lys Thr Thr Ala Ser
60 65

THIS PAGE BLANK (USP)

PCT

WELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro



INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation ⁶ : C12N 15/86, 5/10, A61K 48/00		A3	(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/28489
		(43) Internationales Veröffentlichungsdatum:	10. Juni 1999 (10.06.99)
(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/03543		(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR, KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN, MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK, SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW, ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW), eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ, TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES, FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE, SN, TD, TG).	
(22) Internationales Anmeldedatum: 27. November 1998 (27.11.98)			
(30) Prioritätsdaten: 197 25 854.6 28. November 1997 (28.11.97) DE			
(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BUNDESREPUBLIK DEUTSCHLAND letztvertreten durch DEN PRÄSIDENTEN DES PAUL-EHRLICH INSTITUTS PROF. DR. R. KURTH [DE/DE]; Paul-Ehrlich-Strasse 51-59, D-63225 Langen (DE).			
(72) Erfinder; und		Veröffentlicht Mit internationalem Recherchenbericht. Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen eintreffen.	
(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): CICHUTEK, Klaus [DE/DE]; Großer Hasenpfad 114, D-60598 Frankfurt am Main (DE). ENGELSTÄDTER, Martin [DE/DE]; Isarstrasse 8, D-63110 Rodgau (DE).			
(74) Anwälte: VOSSIUS, Volker usw.; Holbeinstrasse 5, D-81679 München (DE).		(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenberichts: 22. Juli 1999 (22.07.99)	

(54) Title: CELL-SPECIFIC RETROVIRAL VECTORS WITH ANTIBODY DOMAINS AND METHOD FOR THE PRODUCTION THEREOF FOR SELECTIVE GENE TRANSFER

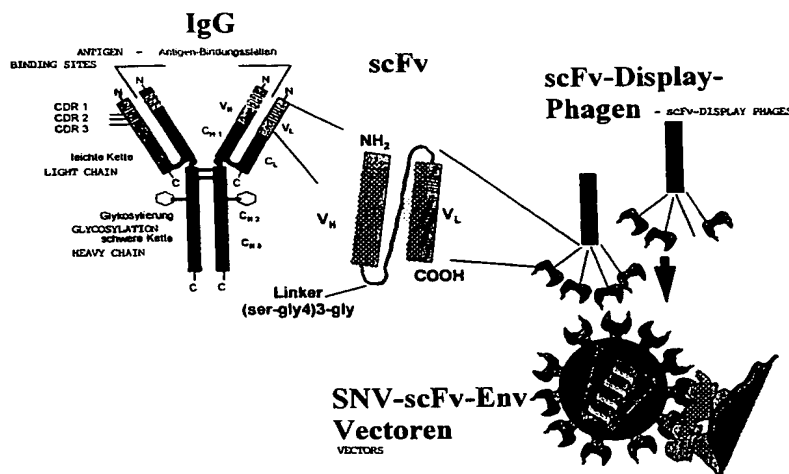
(54) Bezeichnung: ZELLSPEZIFISCHE RETROVIRALE VEKTOREN MIT ANTIKÖRPERDOMÄNEN UND VERFAHREN ZU IHRER HERSTELLUNG FÜR DEN SELEKTIVEN GENTRANSFER

(57) Abstract

The invention relates to cell- specific retroviral vectors with antibody domains (scFv), which are suitable for cell-specific transduction of a selected mammal cell type (cell targeting). The invention also relates to a method for the production of cell-specific retroviral vectors and to the use thereof in gene transfers in selected cells. The invention further relates to retroviral packaging cells to obtain inventive cell-specific retroviral vectors.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft zellspezifische retrovirale Vektoren mit Antikörpererkennungsdomänen (scFv), die für die zellspezifische Transduktion eines ausgewählten Säugerzelltyps geeignet sind (Zelltargeting), Verfahren zur Herstellung der zellspezifischen retroviralen Vektoren und ihre Verwendung zur Genübertragung in ausgewählte Zellen. Die Erfindung betrifft ferner retrovirale Verpackungszellen zur Gewinnung der erfindungsgemässen zellspezifischen retroviralen Vektoren.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshjan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland	ML	Mali	TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	MN	Mongolei	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MR	Mauretanien	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MW	Malawi	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MX	Mexiko	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CG	Kongo	KE	Kenia	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	PL	Polen		
CM	Kamerun	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CN	China	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CU	Kuba	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
CZ	Tschechische Republik	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DE	Deutschland	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
DK	Dänemark	LR	Liberia	SG	Singapur		
EE	Estland						

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 98/03543

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/86 C12N5/10 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 23846 A (UNIV MEDICINE & DENTISTRY OF N) 8 September 1995 see the whole document ---	10-18
X	CHU T. H. ET AL.: "Toward highly efficient cell-type- specific gene transfer with retroviral vectors displaying single-chain antibodies." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 71, no. 1, January 1997, pages 720-725, XP002103150 cited in the application see the whole document --- -/--	10-18



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier document but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 May 1999

Date of mailing of the international search report

04/06/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mandl, B

INTER ONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 98/03543

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHISWELL D. J. ET AL.: "PHAGE ANTIBODIES: WILL NEW 'COLICLONAL' ANTIBODIES REPLACE MONOCLONAL ANTIBODIES?" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, vol. 10, no. 3, 1 March 1992, pages 80-84, XP000249633 cited in the application see the whole document ---	1-9
A	LANG I. M. ET AL.: "Recombinant rabbit Fab with binding activity to type-1 plasminogen activator inhibitor derived from a phage-display library against human alpha-granules" GENE, vol. 172, no. 2, 26 June 1996, pages 295-298, XP002103151 see the whole document ---	1-9
A	WO 93 01288 A (DEUTSCHES KREBSFORSCH) 21 January 1993 see the whole document ---	1-9
A	EP 0 104 014 A (SLOAN KETTERING INST CANCER) 28 March 1984 see the whole document ---	1-9
T	JIANG A. ET AL.: "Cell-type-specific gene transfer into human cells with retroviral vectors that display single-chain antibodies." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 72, no. 12, December 1998, pages 10148-10156, XP002103152 see the whole document -----	10-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 98/03543

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Observation: Although Claim(s) 11 relate(s) to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/ composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 98/03543

Patent document cited in search report		Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9523846	A	08-09-1995	CA 2184354 A	08-09-1995
			EP 0786010 A	30-07-1997
			JP 10501403 T	10-02-1998
			US 5869331 A	09-02-1999
WO 9301288	A	21-01-1993	DE 4122599 A	04-02-1993
			EP 0547201 A	23-06-1993
			JP 6500930 T	27-01-1994
			US 5849500 A	15-12-1998
EP 0104014	A	28-03-1984	US 4642291 A	10-02-1987
			CA 1210346 A	26-08-1986

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES
IPK 6 C12N15/86 C12N5/10 A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N A61K C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie*	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 95 23846 A (UNIV MEDICINE & DENTISTRY OF N) 8. September 1995 siehe das ganze Dokument ---	10-18
X	CHU T. H. ET AL.: "Toward highly efficient cell-type- specific gene transfer with retroviral vectors displaying single-chain antibodies." JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 71, Nr. 1, Januar 1997, Seiten 720-725, XP002103150 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	10-18
	--- -/--	

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

* Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderscher Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

25. Mai 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

04/06/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde
Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mandl, B

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	CHISWELL D. J. ET AL.: "PHAGE ANTIBODIES: WILL NEW 'COLICLONAL' ANTIBODIES REPLACE MONOCLONAL ANTIBODIES?" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, Bd. 10, Nr. 3, 1. März 1992, Seiten 80-84, XP000249633 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-9
A	LANG I. M. ET AL.: "Recombinant rabbit Fab with binding activity to type-1 plasminogen activator inhibitor derived from a phage-display library against human alpha-granules" GENE, Bd. 172, Nr. 2, 26. Juni 1996, Seiten 295-298, XP002103151 siehe das ganze Dokument ---	1-9
A	WO 93 01288 A (DEUTSCHES KREBSFORSCH) 21. Januar 1993 siehe das ganze Dokument ---	1-9
A	EP 0 104 014 A (SLOAN KETTERING INST CANCER) 28. März 1984 siehe das ganze Dokument ---	1-9
T	JIANG A. ET AL.: "Cell-type-specific gene transfer into human cells with retroviral vectors that display single-chain antibodies." JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 72, Nr. 12, Dezember 1998, Seiten 10148-10156, XP002103152 siehe das ganze Dokument -----	10-18

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

ationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/ 03543

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl der(die) Anspruch(üche) 11
sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen
K rpers bezieht(en), wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich
auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,
daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefördert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RESEARCHERBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/03543

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9523846 A	08-09-1995	CA 2184354 A	08-09-1995
		EP 0786010 A	30-07-1997
		JP 10501403 T	10-02-1998
		US 5869331 A	09-02-1999
WO 9301288 A	21-01-1993	DE 4122599 A	04-02-1993
		EP 0547201 A	23-06-1993
		JP 6500930 T	27-01-1994
		US 5849500 A	15-12-1998
EP 0104014 A	28-03-1984	US 4642291 A	10-02-1987
		CA 1210346 A	26-08-1986

PCT
ELTORGANISATION FÜR GEISTIGES EIGENTUM
Internationales Büro
INTERNATIONALE ANMELDUNG VERÖFFENTLICHT NACH DEM VERTRAG ÜBER DIE
INTERNATIONALE ZUSAMMENARBEIT AUF DEM GEBIET DES PATENTWESENS (PCT)

(51) Internationale Patentklassifikation⁶ :
C12N 15/86, 5/10, A61K 48/00

A3

(11) Internationale Veröffentlichungsnummer: WO 99/28489

(43) Internationales
Veröffentlichungsdatum: 10. Juni 1999 (10.06.99)

(21) Internationales Aktenzeichen: PCT/DE98/03543

(22) Internationales Anmeldedatum: 27. November 1998
(27.11.98)

(30) Prioritätsdaten:
197 25 854.6 28. November 1997 (28.11.97) DE

(71) Anmelder (für alle Bestimmungsstaaten ausser US): BUN-
DESREPUBLIK DEUTSCHLAND letztvertreten durch
DEN PRÄSIDENTEN DES PAUL-EHRlich INSTITUTS
PROF. DR. R. KURTH [DE/DE]; Paul-Ehrlich-Strasse
51-59, D-63225 Langen (DE).

(72) Erfinder; und

(75) Erfinder/Anmelder (nur für US): CICHUTEK, Klaus
[DE/DE]; Großer Hasenpfad 114, D-60598 Frankfurt
am Main (DE). ENGELSTÄDTER, Martin [DE/DE];
Isarstrasse 8, D-63110 Rodgau (DE).

(74) Anwälte: VOSSIUS, Volker usw.; Holbeinstrasse 5, D-81679
München (DE).

(81) Bestimmungsstaaten: AL, AM, AT, AU, AZ, BA, BB, BG,
BR, BY, CA, CH, CN, CU, CZ, DK, EE, ES, FI, GB, GD,
GE, GH, GM, HR, HU, ID, IL, IS, JP, KE, KG, KP, KR,
KZ, LC, LK, LR, LS, LT, LU, LV, MD, MG, MK, MN,
MW, MX, NO, NZ, PL, PT, RO, RU, SD, SE, SG, SI, SK,
SL, TJ, TM, TR, TT, UA, UG, US, UZ, VN, YU, ZW,
ARIPO Patent (GH, GM, KE, LS, MW, SD, SZ, UG, ZW),
eurasisches Patent (AM, AZ, BY, KG, KZ, MD, RU, TJ,
TM), europäisches Patent (AT, BE, CH, CY, DE, DK, ES,
FI, FR, GB, GR, IE, IT, LU, MC, NL, PT, SE), OAPI Patent
(BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GW, ML, MR, NE,
SN, TD, TG).

Veröffentlicht

Mit internationalem Recherchenbericht.

Vor Ablauf der für Änderungen der Ansprüche zugelassenen
Frist. Veröffentlichung wird wiederholt falls Änderungen
eintreffen.

(88) Veröffentlichungsdatum des internationalen Recherchenbe-
richts: 22. Juli 1999 (22.07.99)

(54) Title: CELL-SPECIFIC RETROVIRAL VECTORS WITH ANTIBODY DOMAINS AND METHOD FOR THE PRODUCTION
THEREOF FOR SELECTIVE GENE TRANSFER

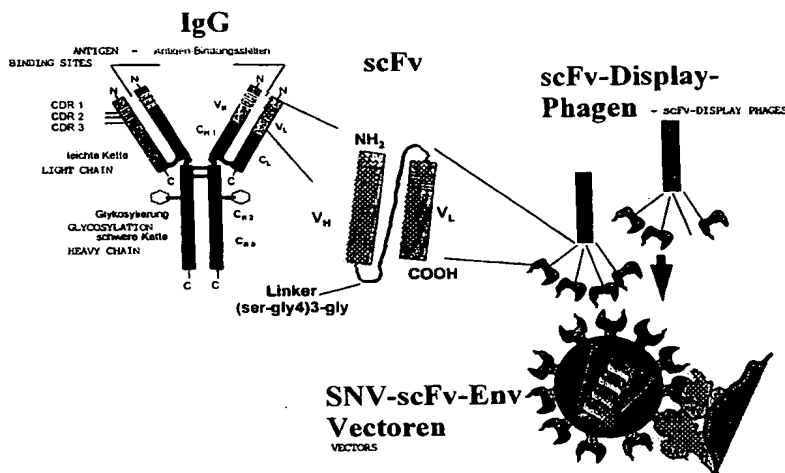
(54) Bezeichnung: ZELLSPEZIFISCHE RETROVIRALE VEKTOREN MIT ANTIKÖRPERDOMÄNEN UND VERFAHREN ZU IHRER
HERSTELLUNG FÜR DEN SELEKTIVEN GENTRANSFER

(57) Abstract

The invention relates to cell- specific retroviral
vectors with antibody domains (scFv), which are
suitable for cell-specific transduction of a selected
mammal cell type (cell targeting). The invention also
relates to a method for the production of cell-specific
retroviral vectors and to the use thereof in gene
transfers in selected cells. The invention further relates
to retroviral packaging cells to obtain inventive cell-
specific retroviral vectors.

(57) Zusammenfassung

Die Erfindung betrifft zellspezifische retrovirale
Vektoren mit Antikörpererkennungsdomeänen (scFv),
die für die zellspezifische Transduktion eines
ausgewählten Säugerzelltyps geeignet sind
(Zelltargeting), Verfahren zur Herstellung der
zellspezifischen retroviralen Vektoren und ihre
Verwendung zur Genübertragung in ausgewählte
Zellen. Die Erfindung betrifft ferner retrovirale
Verpackungszellen zur Gewinnung der
erfindungsgemäßen zellspezifischen retroviralen
Vektoren.



LEDIGLICH ZUR INFORMATION

Codes zur Identifizierung von PCT-Vertragsstaaten auf den Kopfbögen der Schriften, die internationale Anmeldungen gemäss dem PCT veröffentlichen.

AL	Albanien	ES	Spanien	LS	Lesotho	SI	Slowenien
AM	Armenien	FI	Finnland	LT	Litauen	SK	Slowakei
AT	Österreich	FR	Frankreich	LU	Luxemburg	SN	Senegal
AU	Australien	GA	Gabun	LV	Lettland	SZ	Swasiland
AZ	Aserbaidshan	GB	Vereinigtes Königreich	MC	Monaco	TD	Tschad
BA	Bosnien-Herzegowina	GE	Georgien	MD	Republik Moldau	TG	Togo
BB	Barbados	GH	Ghana	MG	Madagaskar	TJ	Tadschikistan
BE	Belgien	GN	Guinea	MK	Die ehemalige jugoslawische Republik Mazedonien	TM	Turkmenistan
BF	Burkina Faso	GR	Griechenland			TR	Türkei
BG	Bulgarien	HU	Ungarn	ML	Mali	TT	Trinidad und Tobago
BJ	Benin	IE	Irland	MN	Mongolei	UA	Ukraine
BR	Brasilien	IL	Israel	MR	Mauretanien	UG	Uganda
BY	Belarus	IS	Island	MW	Malawi	US	Vereinigte Staaten von Amerika
CA	Kanada	IT	Italien	MX	Mexiko		
CF	Zentralafrikanische Republik	JP	Japan	NE	Niger	UZ	Usbekistan
CG	Kongo	KE	Kenia	NL	Niederlande	VN	Vietnam
CH	Schweiz	KG	Kirgisistan	NO	Norwegen	YU	Jugoslawien
CI	Côte d'Ivoire	KP	Demokratische Volksrepublik Korea	NZ	Neuseeland	ZW	Zimbabwe
CM	Kamerun			PL	Polen		
CN	China	KR	Republik Korea	PT	Portugal		
CU	Kuba	KZ	Kasachstan	RO	Rumänien		
CZ	Tschechische Republik	LC	St. Lucia	RU	Russische Föderation		
DE	Deutschland	LI	Liechtenstein	SD	Sudan		
DK	Dänemark	LK	Sri Lanka	SE	Schweden		
EE	Estland	LR	Liberia	SG	Singapur		

Zellspezifische retrovirale Vektoren mit Antikörperdomänen und Verfahren zu
ihrer Herstellung für den selektiven Gentransfer

5

Die Erfindung betrifft zellspezifische retrovirale Vektoren mit Antikörpererkennungsdomänen (scFv), die für die zellspezifische Transduktion eines ausgewählten Säugerzelltyps geeignet sind (Zelltargeting), Verfahren zur Herstellung der zellspezifischen retroviralen Vektoren und
10 ihre Verwendung zur Genübertragung in ausgewählte Zellen. Die Erfindung betrifft ferner retrovirale Verpackungszellen zur Gewinnung der erfindungsgemäßen zellspezifischen retroviralen Vektoren.

Die Mehrheit der retroviralen Vektoren, die in der gentherapeutischen Forschung zur Zeit
15 benutzt werden, stammen vom amphotropen Maus-Leukämie-Virus (MLV) ab. Der Wirtszellbereich des amphotropen MLV wird durch das Oberflächen-Hüllprotein (SU) bestimmt, das vom env-Gen codiert wird. Die Proteinprodukte des env-Gens bilden die äußere Hülle des retroviralen Vektors. Die SU-Proteine interagieren mit, d.h. sie binden an ein bestimmtes Protein (Rezeptor) auf der Oberfläche der Wirtszelle. Die env-Genprodukte des
20 amphotropen MLV erlauben den Gentransfer in eine große Anzahl unterschiedlicher Säugerzellen. Ein selektiver Gentransfer in bestimmte Zell- oder Gewebetypen des Menschen oder anderer Säuger ist mit amphotropen MLV-Vektoren aber nicht möglich, weil der Rezeptor für die MLV-Hüllproteine auf der Oberfläche der Säugerzellen, welches den Eintritt von amphotropen MLV-Vektoren und den Gentransfer vermittelt, auf fast allen diesen Zellen
25 zu finden ist. Der Wirtszellbereich des amphotropen MLV ist daher nicht spezifisch.

Eine Wirtszellspezifität ist z.B. für den gentherapeutischen Einsatz jedoch von Vorteil, da bei einer Gentherapie außerhalb des Organismus (*ex vivo*) (Anderson et al., *Science* 256 (1992), 808-813; Yu et al., *H. Gene Therapy* 8 (1997), 1065-1072) aufwendige Aufreinigungen von
30 Zellen vermieden werden. Für den Therapie-, Diagnostik- oder Impf-Einsatz *in vivo* ist erwünscht, daß die retroviralen Vektoren gezielt die gewünschten Wirtszellen ansteuern und anschließend das therapeutische Gen übertragen. Eine Einengung des Wirtszellbereichs des

amphotropen MLV konnte durch Modifikation des Oberflächenhüllproteins erreicht werden. Eine Modifikation des Oberflächenhüllproteins wurde durch die Fusion mit einer Hormondomäne durchgeführt. Es fand eine Transduktion der Zellen statt, die den spezifischen Hormonrezeptor trugen (Kasahara et al., *Science* 266 (1994), 1373-1375). Ferner wurde das

5 Oberflächenhüllprotein durch Fusion mit einem einkettigen Antikörperfragment (*single chain variable fragment*, nachfolgend auch "scFv" bezeichnet) modifiziert. Das Fragment repräsentierte die antigenbindende Domäne eines Antikörpers und ist ein Fusionsprotein, das aus den variablen Domänen Vh und Vl eines monoklonalen Antikörpers zusammengesetzt ist. Die beiden Domänen sind über ein Glycin- und Serin-Oligopeptid [-(ser-gly4)3-gly-]]

10 verknüpft, das die korrekte Faltung des Fusionsproteins ermöglicht (Huston et al., *Methods Enzymol.* 203 (1991), 46-88, Whitlow et al., *Methods: A companion to Methods Enzymol.* 2 (1991), 97-105). Alle bisher durchgeführten Modifikationen des MLV-Oberflächenhüllproteins mit einem scFv zeigten, daß es zwar zu einer Bindung der Vektoren an die Wirtszellzelle kam, nicht jedoch zu einem Eintritt in die Zelle (Russel et al., *Nucleic Acid Res.* 21 (1993), 1081-

15 1985). Weiterhin ist bekannt, daß das Oberflächenhüllprotein des MLV generell keine umfangreichen Modifikationen erlaubt (Cosset et al., *J. Virol* 69 (1995), 6314-632). Modifikationen, bei denen ein Teil der Bindungsdomäne des MLV-SU-Proteins ersetzt wurde, führten oft zu einer inkorrekten Prozessierung und somit zu einem defekten Transport des SU-Proteins an die Zelloberfläche (Weiss et al., *In J.A.Levy (ed.). The Retroviridae* 2 (1993), 1-

20 108 ; Morgan et al., *J. Virol.* 67 (1993), 4712-4721; Russel et al., *Nucleic Acid Res.* 21 (1993), 1081-1985). Die Entwicklung zellspezifischer retroviraler Vektoren auf Basis des MLV mit veränderten Oberflächenhüllproteinen ist daher wenig erfolgversprechend.

Retrovirale Vektoren auf Basis des Milznekrosevirus SNV ("Spleen Necrosis Virus") sind für

25 einen gezielten Gentransfer in z.B. humane Zellen geeigneter, da das Oberflächen-Hüllprotein des SNV umfangreiche Modifikationen erlaubt und auch dann noch korrekt prozessiert wird (Martinez und Dornburg, *Virol.* 208 (1995), 234-241; Chu et al., *Gene Therapie* 1 (1994), 292-299; Chu und Dornburg, *J. Virol.* 69 (1995), 2659-2663). Zur Herstellung derartiger Vektoren benötigt man mindestens zwei Komponenten. Zum einen ist ein sog.

30 Expressionskonstrukt herzustellen, das eine Verpackung in und den Transfer durch einen Retrovirus erlaubt. Das Expressionskonstrukt umfaßt ein kodierendes DNA-Fragment des gewünschten Genprodukts, z.B. ein Gen für die Gentherapie oder als Impfstoff. Das Expressionskonstrukt muß eine Nukleotidsequenz umfassen, die als Verpackungssignal psi (ψ)

bezeichnet wird und die effiziente Verpackung der mRNA in retrovirale Partikel steuert. Ferner benötigt man eine Verpackungs- oder Helferzelle, welche die gag-, pol- und env-Genprodukte des SNV bereitstellt, ohne daß die gag-, pol- und env-Gene in ein Retrovirus verpackt werden können. Die in der Verpackungszelle befindlichen gag-, pol- und env-Gene müssen psi-negativ
5 sein. Nach Überführung des Expressionskonstruktes durch Transfektion der entsprechenden Plasmid-DNA in die Verpackungszellen werden retrovirale Partikel in den Zellkulturüberstand abgegeben, die das Expressionskonstrukt enthalten und nur dieses, nicht jedoch die gag-, pol-, und env-Gene in die Zielzelle überführen können. Diese Vektoren sind vermehrungsunfähig und durchlaufen lediglich eine Replikationsrunde. Das allgemeine Verfahren zur Herstellung von
10 vermehrungsunfähigen retroviralen Vektoren ist Stand der Technik (Weiss et al., *In J.A. Levy* (ed.). *The Retroviridae* 2 (1993), 1-108 ; Morgan et al., *J. Virol.* 67 (1993), 4712-4721; Russel et al., *Nucleic Acid Res.* 21 (1993), 1081-1985; Cosset et al., *J. Virol* 69 (1995); Martinez und Dornburg, *Virol.* 208 (1995), 234-241; Chu et al., *Gene Therapie* 1 (1994), 292-299; Chu und Dornburg, *J. Virol.* 69 (1995), 2659-2663).

15 Auch der Tropismus (Wirtszellspezifität) des Milznekrosevirus wird durch das Oberflächenhüllprotein (SU-Protein) bestimmt, das vom env-Gen des SNV codiert wird. Das Wildtyp-SNV-Oberflächenhüllprotein läßt keinen selektiven Gentransfer in bestimmte Zellen oder Gewebe des Menschen zu, da das spezifische Empfängerprotein (Rezeptor) nicht auf der
20 Oberfläche von humanen Zellen vorhanden ist (Dornburg, *Gene Therapie* 2 (1995), 1-10). Deshalb wurde ein Verfahren entwickelt, um das SU-Protein des SNV gegen die antigenerkennende Domänen von Antikörpern zu ersetzen. Diese [SNV-scFV-Env]-Vektoren mit den zwei bisher bekannten unterschiedlichen scFv waren in der Lage, das psi-positive Reportergen, die bakterielle β -Galaktosidase, in die ausgewählte humanen Zielzellen zu
25 übertragen. Diese scFv sind gegen das Hapten Dinitrophenol (DNP) bzw. gegen ein unbekanntes Oberflächenmolekül auf Colon-CA-Zellen und anderen Krebszellen gerichtet. (Chu et al., *Gene Therapie* 1 (1994), 292-299; Chu et al., *BioTechniques* 18 (1995), 890-899; Chu und Dornburg, *J. Virol.* 71 (1997), 720-725). Es wurde eine Verpackungszelllinie (DSH-CXL) entwickelt, die sowohl die psi-negativen SNV-Gene gag, pol und env als auch das psi-
30 positive Reportergen-Expressionskonstrukt (pCXL) enthält. Nach Transfektion der Verpackungszelle mit der Plasmid-DNA eines weiteren env-Expressionsgens (pTC53), bei dem das gesamte Oberflächen-Hüllprotein gegen ein einkettiges Antikörperfragment (scFv) ersetzt wurde, wurden retrovirale Vektoren in den Zellüberstand abgegeben, die auf ihrer Oberfläche

neben dem Wildtyp-Oberflächenhüllprotein auch das chimäre [scFv-Env]-Oberflächenprotein trugen. Mit Hilfe dieser Vektoren konnte das Reportergen in die für die scFv-spezifischen Zielzellen, Hundeosteosarkomzellen (D17) die mit DNP konjugiert waren, bzw. HeLa-Zellen (humane Cervixkarzinomzellen) transferriert werden. Bei diesem beschriebenen Verfahren zur Herstellung zellspezifischer retroviraler Vektoren ist jedoch von Nachteil, daß nur bereits bekannte und klonierte scFv verwendet werden können. Ferner wurde von uns festgestellt, daß nicht jedes scFv als Teil eines [SNV-scFv-Env]-Vektors für die Zelltransduktion (Übertragen des gewünschten Gens auf die Zielzelle) geeignet ist.

10 Der Gentransfer in Säugerzellen mittels Retroviren hat generell folgende Vorteile:

- Es wird in der Regel eine Kopie des gewünschten Gens in die Säugerzelle überführt.
- Das gewünschte Gen wird im allgemeinen ohne Mutation oder Rearrangements übertragen.
- Es erfolgt ein stabiler Einbau des gewünschten Gens in das Genom der Zielzelle.

Weiterhin ist erwünscht, daß der retrovirale Vektor eine bestimmte Zellspezifität besitzt, durch die das z.B. therapeutische Gen in eine ausgewählte Zellpopulation eingeführt werden kann.

Der Erfindung liegt daher die Aufgabe zugrunde, zellspezifische retrovirale Vektoren mit Antikörpererkennungsdomänen für den selektiven Gentransfer in Säugerzellen sowie ein universelles Verfahren zu ihrer Herstellung bereitzustellen. Mit Hilfe dieser Vektoren gelingt es, den Gentransfer zu verbessern. Der Erfindung liegt ferner die Aufgabe zugrunde retrovirale Verpackungszellen zur Gewinnung der erfindungsgemäßen Vektoren bereitzustellen. Die Lösung dieser Aufgaben ergibt sich aus den Patentansprüchen, der nachfolgenden Beschreibung und den Figuren.

25 Die Aufgabe wird durch das erfindungsgemäße Verfahren zur Herstellung zellspezifischer retroviraler Vektoren gelöst, umfassend die folgenden Schritte: a) Immunisieren eines Säugetiers mit einer oder mehreren Zellpopulation(en), b) Isolieren von RNA aus dem immunisierten Säugetier, umfassend die B-Zell-RNA, c) Herstellen von cDNA-Abschnitte der variablen Regionen der schweren und leichten Kette der Immunglobuline aus der isolierten
30 RNA mittels RT-PCR mit Primern für die schwere und leichte Kette der Immunglobuline, wobei die Primer die Nukleinsäuresequenz für einen Oligopeptidlinker umfassen, d) Ligieren der cDNA-Abschnitte zu scFv-cDNAs, e) Ligieren der scFv-cDNAs in einen Phagemid-Vektor und Transformieren eines Wirtsbakteriums mit dem Phagemid-Vektor, f) Isolieren von Phagen,

die an die in Schritt a) verwendete(n) Zellpopulation(en) binden, durch Selektion, g) Isolieren von zellspezifischen Phagen aus den in Schritt f) erhaltenen Phagen, die nur an die in Schritt a) verwendete(n) Zellpopulation(en) binden, durch Selektion, h) Ausschneiden der scFv-codierenden DNA-Fragmente aus den in Schritt g) erhaltenen zellspezifischen Phagen und
5 Ligieren in einen psi-negativen retroviralen Env-Expressionsvektor, i) Transformieren des erhaltenen Env-scFv-Expressionsvektors in eine Verpackungszelle, und j) Isolieren der von der Verpackungszelle sezernierten retroviralen Vektoren.

Gegebenenfalls umfaßt das erfindungsgemäße Verfahren weiter die Vereinzelung der in Schritt
10 g) erhaltenen zellspezifischen Phagen. Gegebenenfalls umfaßt das erfindungsgemäße Verfahren weiter den Schritt: k) Isolieren der von der Verpackungszelle sezernierten retroviralen Vektoren, die die Zellen der Zellpopulation(en) transduzieren durch Selektion. Ferner können die Schritte f) und/oder g) mindestens einmal wiederholt werden.

15 Bevorzugt ist ein Verfahren, wobei das immunisierte Säugetier ausgewählt ist aus der Gruppe Maus, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen, Ziege oder Schaf. Bevorzugt ist ebenfalls ein Verfahren, bei dem die Zellpopulation(en) ausgewählt ist aus der Gruppe Mensch, Maus, Ratte, Schaf, Rind oder Schwein. Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem die Zellpopulation(en) ausgewählt ist (sind) aus der Gruppe T-Zellen, Epithelzellen, Muskelzellen,
20 Stammzellen, neurale Zellen, hämatopoietische Zellen, Karzinomzellen oder Leberzellen. Bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem das env-Gen vom Milznekrosevirus (SNV) stammt. Besonders bevorzugt ist ein Verfahren, bei dem der Expressionsvektor der Vektor mit der Bezeichnung pTC53 ist.

25 Die mit dem erfindungsgemäßen Verfahren erhältlichen zellspezifischen retroviralen Vektoren können als Arzneimittel verwendet werden. Bevorzugt ist die Verwendung zur Herstellung eines Arzneimittels zur Gentherapie, Impftherapie oder Diagnostik. Besonders bevorzugt ist die Therapie der Cystischen Fibrose, des ADA-Mangels, von HIV-Infektionen, Leukämie, chronischer Granulomatose.

30 Die Erfindung wird ferner glöst durch die Bereitstellung von retroviralen Verpackungszellen zur Gewinnung der erfindungsgemäßen retroviralen Vektoren, transformiert sowohl mit einem oder mehreren psi-negativen Expressionskonstrukt(en), die die gag-, pol- und/oder env-

Genprodukte exprimieren, als auch mit einem psi-negativen Env-scFv-Expressionskonstrukt nach Anspruch 1 h). Bevorzugt ist eine Verpackungszelle, ferner umfassend ein psi-positives Expressionskonstrukt, umfassend ein Nukleinsäurefragment, das in die durch den retroviralen Vektor zu transduzierende Zelle eingeführt werden soll. Besonders bevorzugt ist eine Verpackungszelle, wobei das Nukleinsäurefragment ein therapeutisches Gen oder dessen DNA-Fragment und/oder ein Reportergen umfaßt. Insbesondere bevorzugt ist eine Verpackungszelle, wobei das therapeutische Gen oder dessen Nukleinsäurefragment das CFTR-, phox91-, ADA-, IL-16-, p53- oder revM10-Gen oder Impfgene z. B. rekombinantes gp120 und IL-16 umfaßt. Ferner insbesondere bevorzugt ist eine Verpackungszelle, wobei das Reportergen β -Galaktosidase, "Green Fluorescent Protein", Luciferase oder Neomycin umfaßt.

Die Abbildungen dienen der Erläuterung der Erfindung

Abb.1 zeigt schematisch die Env-scFv Expressionskonstrukt pTC53, pT-scFv und pT/zeo, deren Transfektion in die Verpackungszelle DSH-CXL, die die erfindungsgemäßen Vektoren sezerniert.

Abb.2 zeigt schematisch die Herstellung, Isolierung und Selektion der erfindungsgemäßen Vektoren.

Abb.3 ist eine schematische Darstellung eines Immunglobulins und das daraus resultierende scFv. Dargestellt sind weiterhin schematisch scFv-Display-Phagen und SNV-scFv-Env-Vektoren

Abb. 4 zeigt die Nukleinsäuresequenz von pTC53.

Der hier verwendete Begriff amphotropes Virus bedeutet Infektion und Replikation auf murinen und humanen Zellen, im Gegensatz zu ecotropen Viren, das nur auf murinen Zellen repliziert. Der hier verwendete Begriff retroviraler Vektor bedeutet replikationsdefizientes retrovirales Viruspartikel, das anstelle der retroviralen mRNA eine fremde eingeführte RNA eines Gens, z.B. eines therapeutischen Gens oder dessen Fragment oder eines Reportergens übertragen kann. Der hier verwendete Begriff Antikörpererkennungsdomäne (scFv) bedeutet Antigenbindestelle eines Antikörpers, umfassend Vh- und Vl-Kette. Der hier verwendete

Begriff SNV bedeutet Milznekrosevirus mit seinen Stämmen und Substämmen. SNV gehört zu den Reticulo Endotheliose Viren (REV) der Vögel, Typ D-Retrovirus.

- Für die Bereitstellung der zellspezifischen Antikörpererkennungsdomänen (scFv) wird eine neue kombinatorische Phagen-cDNA-Bibliothek der variablen Domänen der leichten und schweren Ketten der Immunglobuline hergestellt. Dazu wird ein Säugetier, z.B. eine Maus, Ratte, ein Kaninchen, Meerschweinchen, Ziege oder Schaf, mit einem ausreichenden Titer einer oder mehrerer Zellpopulation(en) in üblicher Weise immunisiert. Die Zellpopulation ist die Zellart, die einen Oberflächenrezeptor ausbildet, an den die erfindungsgemäßen retroviralen Vektoren spezifisch binden. Die Zellen können von einem von dem zu immunisierenden Säugetier verschiedenen Säugetier stammen, z.B. vom Menschen, der Maus, Ratte, dem Schaf, Rind oder Schwein. Die Zellen können solche Zellen sein, in der z.B. eine somatische Gentherapie, eine Impftherapie oder Diagnostik durchgeführt werden soll. Typische Beispiele solcher Zellen sind T-Zellen, Leberzellen, Muskelzellen, neurale Zellen, Fibroblasten, Epithelzellen, Stammzellen oder hämatopoietische Zellen. Für die Immunisierung kann eine Zellpopulation oder mehrere Zellpopulationen gleichzeitig dem Säugetier verabreicht werden, je nachdem für welche Zellpopulation(en) der erfindungsgemäße retrovirale Vektor spezifisch sein soll.
- Für die Herstellung der cDNA-Bibliothek wird zuerst die B-Zell-RNA des immunisierten Säugetiers in bekannter Weise isoliert. Die mRNA-Sequenzen der für die Antigenerkennung verantwortlichen Regionen der schweren und leichten Kette (V_H und V_L) der Immunglobuline werden mittels reverser Transkription und anschließender Polymerase-Kettenamplifikation in üblicher Weise in cDNA umgeschrieben und vervielfältigt. Die Primerpaare und deren Sequenzen für die V_H - und V_L -Regionen sind dem Fachmann bekannt. Sie sind z.B. im kommerziell erhältlichen Kit der Fa. Pharmacia enthalten, bzw. können den bekannten Datenbanken (EMBL) entnommen werden. Dem Fachmann ist bekannt, daß er für jede immunisierte Säugetierart verschiedene Primersequenzen verwenden muß. Die Sequenzen sind ebenfalls in den bekannten Datenbanken enthalten. Die cDNA-Fragmente der V_H - und V_L -Regionen werden dann mittels einer Ligasereaktion in üblicher Weise zu scFv-cDNAs verknüpft. Für den Fachmann ist ersichtlich, daß bei der Ligation unterschiedliche Kombinationen von cDNA-Fragmenten hergestellt werden. Die erhaltenen scFv-cDNAs können dann in einen Phagemid-Vektor z.B. pCANTA 5E Phagemid, Fa. Pharmacia kloniert

werden. Anschließend werden Wirtsbakterien z.B. E.coli TG1 mit dem Phagemid-Vektor transformiert.

Die von den Bakterien produzierten rekombinanten Phagen werden dann in üblicher Weise isoliert und auf das Vorhandensein von zellspezifischen scFv-Peptiden selektioniert. Die Phagen werden mit der Zellpopulation oder den Zellpopulationen in üblicher Weise in Kontakt gebracht, die für die Immunisierung verwendet worden sind. Die Phagen, die nicht an die Zellen binden, tragen kein spezifisches scFv-Peptid und werden durch Waschschr

Die Phagen, die an die Zellen binden, präsentieren das gewünschte scFv-Peptid auf ihrer Oberfläche und werden in üblicher Weise eluiert. Die Phagen, die das gewünschte scFv-Peptid präsentieren, werden vermehrt, indem man sie wieder in üblicher Weise die Wirtsbakterien infizieren läßt. Dieser Selektionsschritt kann ein oder mehrere Male wiederholt werden, um die bindenden Phagen anzureichern. Dieser Vorgang wird als "panning" bezeichnet. Die Phagen werden nach dem panning oder direkt nach dem ersten Selektionsschritt einer weiteren Selektion unterzogen. Dabei werden die Phagen mit einer oder mehreren anderen Zellpopulationen in Kontakt gebracht, die sich von den zur Immunisierung verwendeten Zellen unterscheiden. Die Phagen, die nicht an diese Zellen binden, präsentieren ein zellspezifisches scFv-Peptid. Sie werden in üblicher Weise aus dem Zellüberstand isoliert und für eine Wirtsbakterieninfektion zur Vermehrung verwendet. Auch dieser Selektionsschritt kann ein oder mehrere Male wiederholt werden (Marks et al., *Biotechnologie* 10 (1992), 779; Clackson et al., *Nature* 352 (1991), 624; Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222 (1991), 581; Chaudhary et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 87 (1990), 1066; Chiswell et al., *TIBTECH* 10 (1992), 80; McCafferty et al., *Nature* 348 (1990), 552; Huston et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85 (1988), 5879).

Zur Herstellung der erfindungsgemäßen zellspezifischen retroviralen Vektoren dient die vorstehend beschriebene Phagen-cDNA-Bibliothek als Ausgangsmaterial. Die scFv-cDNAs der Phagen, die nach dem zweiten Selektionsschritt und den gegebenenfalls durchgeführten panning-Verfahren übriggeblieben sind, werden in üblicher Weise aus der Phagen-DNA ausgeschnitten und in ein retrovirales Env-Expressionsgen inseriert. Das retrovirale env-Expressionsgen kann vom SNV stammen. Ein typisches Beispiel für ein SNV-scFv-env-Expressionskonstrukt ist pTC53. Die Sequenz ist in Abbildung 4B gezeigt. Ein typisches Beispiel für ein Wildtyp(wt)-SNV-env-Expressionskonstrukt ist pIM29.

Die Konstruktion der für die wt-SNV-ENV-Proteine z.B. pIM29 und die chimären SNV-scFv-ENV-Proteine kodierenden Expressionplasmide ist von Chu et al. (*J. Virol.* 71 (1997), 720-725) vorbeschrieben. Die Expression der für das wt-env-Gen kodierenden DNA wird von
5 einem MLV-Promotor gesteuert. Die env-cDNA wurde über die Restriktionsschnittstellen SacII und AvrII aus einem für das komplette SNV-Virus kodierenden Plasmids ausgeschnitten und durch Insertion in einen Linker (L) eingefügt. Um eine korrekte Prozessierung des Proteins zu gewährleisten, enthält pIM29 die Polyadenylierungsstelle des Simianen Virus 40 (SV40). Von diesem Plasmid kann somit die Expression des wt-env-Gens erfolgen, so daß
10 nach proteolytischer Spaltung eines Vorläuferproteins das äußere Glykoprotein (SU) und das Transmembranprotein (TM) vorliegt. Es können jedoch andere, dem Fachmann bekannte Plasmide, Promotoren, Linker, Polyadenylierungssignale und weitere für eine korrekte Prozessierung benötigte DNA-Elemente verwendet werden.

15 Zur Expressierung von SNV-scFv-ENV-Proteinen werden die in bekannter Weise erhaltenen scFv in ein SNV-ENV-Expressionskonstrukt z.B. pTC53 in üblicher Weise eingeführt. Die in pTC53 vorhandenen Restriktionserkennungstellen für die Enzyme SfiI und NotI ermöglichen die molekulare Klonierung von z.B. scFv zwischen SNV-env-Leader-Sequenz und dem für das Transmembranprotein (TM-Protein) kodierenden Bereich der DNA. Die im wt-ENV
20 vorhandene Proteaseschnittstelle zwischen SU und TM ist in pTC53 deletiert, so daß ein Fusionsprotein exprimiert wird, das N-terminal aus dem einkettigen Antikörperfragment und C-terminal aus dem SNV-TM besteht. Die regulatorischen Elemente wie MLV-Promotor und SV40-Polyadenylierungssignal sind identisch mit denen des pIM29-Vektors. Zur Verstärkung der Expression eines chimären env-Gens wird in dem Expressionsplasmid pTC53 eine
25 adenovirale Leader-Sequenz z.B. AVtl (Sheay et al. *BioTechniques*, 15 (1993), 856-861) inseriert. Eine Zocin-Kassette (pSV2zeo; Fa. Invitrogen, Niederlande) dient der möglichen Selektionierung von stabil transfizierten Zellen, so daß einzelne Zellklone etabliert werden können.

30 Das psi-negative SNV-scFv-env -Expressionskonstrukt kann mittels Elektroporation oder anderer bekannter Verfahren in üblicher Weise in Verpackungszellen eingeführt werden. Eine typische Verpackungszelle ist z.B. DSH-CXL. Die Verpackungszellen haben ferner psi-negative env, gag, pol-Expressionskonstrukte und für den gewünschten Gentransfer in die

spezifischen Zielzellen ein weiteres psi-positives Expressionskonstrukt, das z.B. ein Gen oder DNA-Fragment für die Gentherapie, Impftherapie oder ein Reportergen für die Diagnostik umfaßt. Nach Transfektion der Verpackungszellen kommt es zu einer transienten Expression und Abgabe der retroviren Vektoren, die neben natürlichen SU-Proteinen rekombinante SU-scFv-Proteine präsentieren, in den Zellkulturüberstand. Die retroviren Vektoren können dann in üblicher Weise zur Transduktion der Zielzelle, d.h. der Zellpopulation, die zur Immunisierung verwendet wurde, eingesetzt werden. Gegebenenfalls kann dieser Schritt ein weiterer Selektionsschritt sein. Nur die erfindungsgemäßen retroviren Vektoren, die die Zielzelle in ausreichender Weise transduzieren, werden weiter verwendet. Diese Vektoren können einem weiteren Selektionsschritt unterzogen werden. Die Vektoren können in üblicher Weise zur Transduktion von anderen Zellpopulationen als der Zellpopulation, mit der das Säugetier immunisiert wurde, eingesetzt werden. Die Vektoren, die nicht die anderen Zellen transduzieren, sondern nur die Zielzellen, können also in einem doppelten Selektionsschritt erhalten werden.

Für die Etablierung von stabilen Verpackungszelllinien, welche die erfindungsgemäßen retroviren Vektoren konstitutiv abgeben, kann ein Selektionsmarker, z.B. das Zeocin-Resistenzgen (Fa. Invitrogen), in üblicher Weise in das scFv-Expressionskonstrukt z.B. pTC53 inseriert werden. Die mit dem Zeocin-Resistenz-Gen versehenen scFv-Expressionskonstrukte werden mittels z.B. der Liposomen-Technik (Lipofectamin, Gibco BRL) in die Verpackungszellen transferiert. Nach einer ca. zwei-wöchigen Selektion der Transfektanten in Zeocin-haltigem Kulturmedium können Zellklone etabliert werden, die je nach scFv-cDNA-Fragment Zielzellpopulationen mit einem Titer von etwa 10^4 - 10^6 retroviren Vektoren pro ml transduzierten.

Das mit den erfindungsgemäßen retroviren Vektoren in die Zielzellpopulation oder -populationen transduzierte Gen kann z.B. die RNA eines therapeutischen Gens oder dessen Fragment sein. Therapeutische Gene können z.B. das CFTR-Gen, das ADA-Gen, der LDL-Rezeptor, β -Globin, Faktor VIII oder Faktor IX, das Dystrophin-Gen sein. Im Falle des CFTR-Gens wären die Zielzellen z.B. die Lungenepithelzellen, beim ADA-Gen die Stammzellen des Knochenmarks oder T-Lymphocyten, beim LDL-Rezeptor die Leberzellen, beim Dystrophin-Gen die Skelettmuskelzellen, beim β -Globin-Gen die hämopoietischen Stammzellen, beim Faktor VIII oder Faktor IX die Fibroblasten und Leberzellen. Dem

Fachmann ist ersichtlich, daß diese Aufzählung nur eine Auswahl der therapeutischen Gene darstellt und andere Gen ebenfalls für eine Gentherapie verwendet werden können. Die DNA-Fragmente eines therapeutischen Gens umfassen z.B. Antisense-Nukleinsäuren oder Ribozyme. DNA-Fragmente können ferner Bereiche eines Gens umfassen, die die

5 Trinukleotidwiederholungen von z.B. des Fragile X Gens enthalten.

Ferner kann die RNA eines Reportergens, z.B. β -Galaktosidase, GFP, Luciferase oder Neomycin in die erfindungsgemäßen retroviralen Vektoren eingeführt werden. Die Reportergene ermöglichen, festzustellen, ob die Zielzellen mit den retroviralen Vektoren

10 transduziert worden sind.

Ferner kann die RNA eines Gens oder dessen Fragment zu Imp fzwecken in die Zielzelle transduziert werden. Ein typisches "Impfgen" ist z.B. das rekombinante gp120 oder gp160 von HIV. Die Transduzierung von Immunzellen mit diesen Genen oder Fragmenten regt zu einer

15 Antikörperbildung gegen die viralen Genprodukte an.

Die erfindungsgemäßen Vektoren können z.B. durch i.v.- oder i.m-Injektionen appliziert werden. Es können jedoch auch die erfindungsgemäßen Verpackungszellen in z.B. Organoide (Teflonbeutel) eingeschlossen werden, die dann in den Organismus eingepflanzt werden und in

20 die Blutbahn oder ins Gewebe die erfindungsgemäßen Vektoren sezernieren. Weitere Applikationsformen sind für den Fachmann offensichtlich.

Die erfindungsgemäße retrovirale Verpackungszelle zur Gewinnung der erfindungsgemäßen pseudotypisierten retroviralen Vektoren wird bereitgestellt, indem eine Zellinie, z.B. eine

25 humane Zellinie mit den psi-negativen Expressionskonstrukten, die die gag- und pol-Genprodukte des SNV exprimieren, und mit dem psi-negativen SNV-Env-Expressionskonstrukt und/oder psi-negativen SNV-scFv-env-Expressionskonstrukt, in üblicher Weise transfiziert wird.

Ferner können Verpackungszellen verwendet werden, die bereits die psi-negativen Expressionskonstrukte für die gag und pol-Genprodukte enthalten. In solche Verpackungszellen müssen dann nur das psi-negative Expressionskonstrukt für die Virushülle und das psi-positive Expressionskonstrukt für die in die Zielzelle zu transduzierende

30

Nukleinsäuresequenz transfiziert werden. Dem Fachmann sind die Verfahren zur Transfektion der Expressionskonstrukte bekannt. Von den erfindungsgemäßen Verpackungszellen werden retrovirale Vektorpartikel in den Zellüberstand abgegeben, die das Expressionskonstrukt enthalten nicht jedoch die Konstrukte, die für die GAG-, POL- und ENV-Proteine kodieren. In die Zielzelle wird somit nur das gewünschte z.B. therapeutische Gen oder Reportergen überführt.

Die dargestellte Erfindung eröffnet die folgenden Möglichkeiten:

- Gene, Gen-Fragmente oder sonstige Nukleinsäuresequenzen können in ausgewählte Säugerzellen überführt werden,
- weitere Effizienzsteigerungen des Nukleinsäuretransfers durch Verbesserung der env-Genkonstrukte können erreicht werden,
- Gentherapie-, Markierungs- und Impfstrategien können entwickelt werden, für die ein selektiver Nukleinsäuretransfer in ausgewählte Säugerzellen wünschenswert ist.

Die folgenden Beispiele erläutern die Erfindung und sind nicht als einschränkend aufzufassen:

1. Isolierung und Klonierung zellspezifischer scFv

Zur Herstellung, Isolierung und Selektion von zellspezifischen scFv wurde eine Maus mit der humanen T-Zelllinie T-C8166 (Clapham et al., *Virology* 158 (1987), 44-51) in üblicher Weise immunisiert, die Milz entfernt und die RNA isoliert. Die Klonierung der scFv-cDNAs wurde mit dem kommerziell erhältlichen Kit der Fa. Pharmacia nach Angaben des Herstellers durchgeführt. Die erhaltenen Phagen wurden in üblicher Weise auf ihre Bindungseigenschaften gegenüber den Zielzellen untersucht. Es wurden 150 Phagen isoliert, die spezifisch an die Zielzellen banden. Die 150 so erhaltenen zellspezifischen scFv wurden verwendet, um die erfindungsgemäßen SNV-scFv-Vektoren herzustellen.

2. Klonieren der spezifischen scFv-cDNA-Fragmente in Env-Expressionskonstrukte

Die scFv-cDNAs der 150 zellspezifischen scFv wurden in üblicher Weise aus der Phagemid-DNA ausgeschnitten und jeweils in das Expressionskonstrukt pTC53 ligiert. pTC53 wurde erhalten durch Modifizierung des universellen eukaryotischen Vektors pRD114 (Chu et al., *J. Virol.* 71 (1997), 720-725; Sheay et al. *BioTechniques*, 15 (1993), 856-861; Chu et al., *BioTechniques*, 18 (1995), 890-895). In diesem Vektor wurde das SNV-wt-env-Gen bis auf

die für die Leader-Sequenz und das Transmembran-Protein kodierende c-DNA deletiert. Ein zusätzlich eingeführter Spacer ermöglicht die Insertion einer Fremd-DNA (hier die scFv-cDNA) im Anschluß an die ENV-Leader-Sequenz über die Restriktionserkennungsstelle NaeI. Die Sequenz von pTC53 ist in Abbildung 4 gezeigt. Für die Insertion der scFv-cDNA wurde das Env-Expressionskonstrukt pTC53 dahingehend modifiziert, daß Sfi I und Not I spezifische Restriktionsendonuklease-Erkennungsstellen in den Linker zwischen der SNV-Leader-Sequenz und der SNV-Transmembran-Sequenz (TM) in üblicher Weise eingefügt werden. Hierzu wird eine rekombinante PCR ausgehend von der DNA des Plasmids PKA1558 (Scov H. & Andersen K.B., 1993) und der für das anti Transferrinrezeptor-scFv kodierenden DNA in üblicher Weise durchgeführt, so daß über Nru I (5' und 3') eine Insertion des amplifizierten Fragments in das Nae I restringierte pTC53 möglich ist. Das so inserierte Fragment enthält die multiple Sfi I / Not I Klonierungsstelle, da die verwendeten Primer neben der endständigen Nru I Erkennungsstelle weiterhin eine benachbarte Sfi I bzw. Not I Erkennungsstelle beinhalten. Für die rekombinante PCR wurden folgende Primer verwendet

PKATFNNRu+:

5'-GGGCCCTCGCGAGCGGCCAGCCGGCCGACATCAAGATGACCCAGTCTCCA-3'

Nru I

Sfi I

PKATFNRNRu-:

5'-GGGCCCTCGCGATGCGGCCGCTGAGGAGACTGTGAGAGTGGTGCC-3'

Nru I

Not I

Die PCR-Bedingungen waren: 94°C/3 min, 94°C/1 min, 59°C/1 min, 72°C/1 min., 25 X Schleifen, 72°C/10 min und dann bis 4°C abkühlen. Das PCR-Fragment wurde gelelektrophoretisch aufgetrennt, aus der Gelmatrix extrahiert (Quiaex, Fa. Quiagen) und mit dem Nae I geöffneten Plasmid pTC53 in üblicher Weise ligiert.

Die scFv-cDNAs aus dem Phagemid (pCANTA 5E) wurden mittels der Restriktionsendonukleasen Sfi I und Not I ausgeschnitten. Dazu wurde Phagemid-Plasmid-DNA mittels bekannter Verfahren hergestellt und jeweils 8µg Plasmid-DNA mit jeweils 60 U der Restriktionsendonukleasen Sfi I und Not I für 1,5h bei 50°C und anschließend 1,5h bei 37°C verdaut. Der Reaktionsansatz fand in einem Volumen von 200µl statt, der mit 20µl BSA (10fach konz.) und 20µl Reaktionspuffer 3 (10fach konz.) supplementiert wurde. Nach

Beendigung der Reaktionszeit wurde der Ansatz in einem 1%igem Agarosegel elektrophoretisch aufgetrennt. Nach der Auftrennung wurde die scFv-cDNA spezifische Bande (ca 750bp) aus dem Agarosegel mittels bekannter Verfahren aufgereinigt.

- 5 Das aufgereinigte Fragment wurde mit dem ebenfalls mit den Reastriktionsendonukleasen Sfi I und Not I geöffneten Env-Expressionskonstrukt pTC53 ligiert. Dazu wurden äquimolare Mengen des scFv-cDNA-Fragments und pTC53-Fragments in einem 15µl Volumen mit 200 U T4-Ligase und 1,5µl 10-fach Ligase-Puffer supplementiert. Der Ansatz wurde bei 4°C Über Nacht inkubiert. Um eine effiziente Transformation von Bakterien zu ermöglichen, wurden die
- 10 Bakterienstämme TOP10F' und JS5 mit einer nach Hanahan (1983) modifizierten Methode kompetent gemacht. Nach dem Animpfen von 100 ml LB-Medium mit 500 µl einer Übernachtskultur wurde die Bakteriensuspension bei 37° C bis zu einer Dichte (OD₅₅₀) von 0,6 inkubiert. Anschließend wurden die Bakterien auf Eis gekühlt, bei 6.000 rpm und 4° C pelletiert (Minifuge RF, Heraeus, Hanau) und in 40 ml TFB1-Puffer (30 mM KOAc, 100mM RbCl₂, 10 mM CaCl₂, 15 % Glycerin, pH 5,8 mit Essigsäure eingestellt, danach sterilfiltriert)
- 15 resuspendiert. Nach einer Inkubationszeit von 15 Minuten auf Eis und einer Zentrifugation bei 6.000 rpm und 4° C wurde das Bakterienpellet in 4 ml TFB2-Puffer (10 mM MOPS, 75 mM CaCl₂, 10 mM RbCl₂, 15 % Glycerin, pH 6,5 mit KOH-Lösung eingestellt, danach sterilfiltriert) resuspendiert. Die Bakteriensuspension wurde dann in Aliquots je 100 µl aufgeteilt und auf Trockeneis schockgefroren. Die Lagerung erfolgte bei -70° C. Zur Transformation wurden 100 µl der kompetenten Bakterien auf Eis aufgetaut und nach Zugabe von 1-2 µl des jeweiligen Ligationsansatzes für 30 Minuten auf Eis inkubiert. Nach einem anschließenden Temperaturschock (45 s bei 42° C anschließend 2 min auf Eis) wurden die Bakterien mit 500 µl SOC-Medium (GIBCO/BRL, Eggenstein) versetzt und bei 37° C für eine
- 20 Stunde zur Expression der Antibiotikaresistenz in einem Bakterienschüttler kultiviert. Die Bakteriensuspension wurde auf LB-Agarplatten, die mit dem Antibiotikum Ampicillin supplementiert waren, ausgestrichen und bei 37° C über Nacht inkubiert.
- 25

- 30 Die Präparation von Plasmiden aus Bakterien (E.coli TopF10) erfolgte mit den QIAGEN-Plasmid-Kits der Firma QIAGEN, Hilden. Für die Präparation einer geringen Menge Plasmid-DNA wurden die Bakterien einer 15 ml-Übernachtskultur (LB-Medium mit 50 µg/ml Ampicillin) mit den vom Hersteller gelieferten Lösungen lysiert und über eine

Anionenaustauscher-Säule (tip-20) gereinigt. Zur Gewinnung großer Mengen Plasmid-DNA (Maxi-Präparation) wurden 400 ml Übernachtskulturen angesetzt

3. Selektion der retroviren Vektoren

- 5 Transiente Transfektion der scFv-pTC53-Expressionskonstrukte in die Verpackungszelle DSH-CXL mittels Elektroporation: Für die Elektroporation wurden jeweils 2×10^6 DSH-CXL Zellen in 480 µl PBS resuspendiert und in eine auf Eis gelagerten Gene-Pulser-Küvette (0,4 cm Elektrode, Lücke 50, Biorad, München) überführt. Danach wurden 20 µg der rekombinanten Plasmid-DNA der Zelllösung zugegeben. Der Inhalt der Küvette wurde einem elektrischen Puls
- 10 in einem Elektroporator (Gene-Pulser Apparatus, Biorad, München) bei 270 V und 960 µF ausgesetzt. Nach einer 10-minütigen Inkubation der Küvette auf Eis wurden die Zellen in 20 ml frisches Kulturmedium in eine mittlere Zellkulturflasche (Nunc, Wiesbaden) überführt. Am nächsten Tag wurden die DSH-CXL-Zellen mit frischem Medium versetzt und kultiviert.
- 15 Der Virus-haltige Überstand der Transfektanden wurde zur Transduktion der Zielzellen eingesetzt. Am Tag vor der Transduktion wurden die C8166-Zielzellen im Verhältnis 1:2 in frisches Medium umgesetzt. Die Überstände wurden mit einem 0,45 µm Filter (Sartorius) steril filtriert. 7 ml des Überstandes wurden dann direkt zur Transduktion von 2×10^5 C8166-Zellen eingesetzt. Um die Anbindung der retroviren Vektoren an die Zelloberfläche zu stabilisieren
- 20 erfolgte eine Zugabe von 40 µg/ml Polybren. Nach einer 2 stündigen Inkubation bei 37° C, wurden die Zellen mit PBS gewaschen und in frisches Kultur-Medium überführt.

- Nachweis der β-Galaktosidase-Aktivität (X-Gal-Assay): Zur Überprüfung einer erfolgreichen Transduktion wurde nach 72 Stunden ein X-Gal-Assay nach der Methode von Sanes *et al.*
- 25 (1986) modifiziert durchgeführt. Der Zellkulturüberstand wurde abgezogen und die Zellen mit PBS ohne (Ca^{2+} und Mg^{2+}) gewaschen. Anschließend wurden die Zellen mit einer Fixierlösung (2 % Formaldehyd, 0,2 % Glutaraldehyd in PBS) für 5 min überschichtet und mit PBS gewaschen. Danach wurden die Zellen in 3 ml X-Gal-Reaktionsmischlösung (1 mg/ml, 5 mM K-Ferricyanid, 5 mM K-Ferrocyanid, 2mM MgCl_2) resuspendiert. Nach einer ca. 4-stündigen
- 30 Inkubation des Ansatzes bei 37° C trat die Blaufärbung der transduzierten Zellen auf.

Von den 150 getesteten scFv-pTC53-Expressionskonstrukten waren 6 zellspezifisch (M8, K6, 7A5, 7E10, 6C3, 7B4). Das heißt es konnten pro zellspezifischem Konstrukt 10-20 blau-gefärbte C8166-Zellen erkannt werden. Das ist im Vergleich zu nicht zellspezifischen scFv-Klonen signifikant. Von 6 zellspezifischen scFv-Expressionskonstrukten wurden stabile Verpackungszelllinien generiert.

4. Etablierung stabiler Verpackungszelllinien

Herstellung des Zeocin-Resistenzgens mittels PCR ausgehend von DNA des Plasmids pSCVZeo (Fa. Invitrogen): Um Verpackungszellen nach einer stabilen Transfektion mit dem pTC53zeo-scFv-Plasmid auf eine stabile Expression des Resistenzgens zu selektionieren, wurde eine Zeocin-Kassette integriert. Hierzu wurde mittels rekombinanter PCR aus dem Vektor pZeoSV2 (+/-) der Firma Invitrogen (NV Leek, Niederlande) eine Zeocin-Kassette amplifiziert und mit den Restriktionsschnittstellen NdeI 5' und 3' versehen, so daß die Kassette anschließend in den NdeI restringierten Anteil des pUC19-Rückgrades des pTC53 inseriert werden konnte. Der PCR-Ansatz (100 µl) enthielt: 1 x PCR-Puffer (Taq: 10 mM Tris/HCl, pH 8,8, 50 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 0,01% Gelatine, 10 µM (+)- und 10 µM (-)-Primer, 200 µM je Desoxynukleotid, 2,5 Einheiten Taq-Polymerase und 100 ng Plasmid-DNA oder. Es wurden folgende Oligonukleotide verwendet.

ZEO2184+NDE:

5'-GGAAATTCCATATGGAATTCCTGTTACATAACTTACGGTAAATGGC-3'

Nde I

ZEO3258-NDE:

5'-GGAATTCCATATGGAATTCCTCAGTCCTGCTCCTCGGCC-3'

Nde I

Die PCR-Bedingungen waren: 94°C/3 min, [94°C/1 min, 60°C/1 min, 72°C/1,5 min.] 30 X Zyklen, 72°C/10 min und 4°C Endtemperatur.

Insertion eines Zeocin-Resistenz-Gen in die im transienten Test positiven scFv-pTC53-Env-Expressionskonstrukte.

Transfektion mittels LipofectaminTM (GIBCO/BRL, Life Technologies, Eggenstein).

LipofectaminTM : N-[2-({2,5bis[-(3-aminopropyl)amino]-1-oxypentyl}amino)ethyl]-N,N-dimethyl-2,3-bis (9-octadecenyloxy)-1-propanaminium trifluoroacetat) /Dioleoyl-phosphatidylethanolamin; 3 : 1 (w/w)

Am Vortag der Transfektion wurden 1×10^6 Zellen in eine 60 mm-Zellkulturschale (Greiner, Nürtingen) ausgesät. Für die Transfektion wurden 1-5 µg (je nach Versuchansatz) der rekombinanten Plasmid-DNA in 200 µl serumfreiem Medium resuspendiert. Parallel dazu wurden 8-25 µl (je nach Versuchansatz) LipofectaminTM in 200 µl serumfreiem Medium verdünnt. Nach dem Vereinigen beider Lösungen, folgte eine Inkubation für 45 min bei RT. Das DNA-Liposomen-Gemisch wurde auf 2 ml Endvolumen aufgefüllt und auf die mit serumfreiem Medium gewaschenen Zellen gegeben. Daraufhin wurden die Zellen für 5 Stunden bei 37° C inkubiert. Anschließend wurden 2 ml frisches Medium zugegeben, das die zweifache Konzentration an FCS enthielt. Am nächsten Tag erfolgte ein Mediumwechsel.

Zur Etablierung stabiler Verpackungszellklone wurden die Zellen 24 Stunden nach der Transfektion mit einem Selektionsmedium überschichtet. Das ZeocinTM-Resistenzgen (*Streptoalloteichus hindustanus* Bleomycin-Gen) wurde als Selektionmarker benutzt. Die Selektion erfolgte in DMEM-Medium, supplementiert mit 525 µg/ml ZeocinTM (Phleomycin von *Streptomyces verticillus*; Invitrogen BV, Niederlande). Die Zellen wurden zweimal wöchentlich mit frischem Selektionsmedium versetzt. Nach ca. 4 Wochen konnten Zellfoci, die Zellklone darstellten, identifiziert werden. Diese Kolonien wurden einzeln abgenommen, in eine 24-Loch-Platte (Flachboden, Nunc, Wiesbaden) in Zellkulturmedium ohne Antibiotikumssupplement überführt. Das Medium wurde zweimal wöchentlich gewechselt. Erlangten die Zellen eine Konfluenz von ca. 90 %, wurden sie in entsprechend größere Zellkulturgefäße expandiert.

Patentansprüche

1. Verfahren zur Herstellung zellspezifischer retroviraler Vektoren, umfassend die folgenden Schritte:
 - a) Immunisieren eines Säugetiers mit einer oder mehreren Zellpopulation(en),
 - b) Isolieren von RNA aus dem immunisierten Säugetier, umfassend die B-Zell-RNA,
 - c) Herstellen von cDNA-Abschnitte der variablen Regionen der schweren und leichten Kette der Immunglobuline aus der isolierten RNA mittels RT-PCR mit Primern für die schwere und leichte Kette der Immunglobuline, wobei die Primer die Nukleinsäuresequenz für einen Oligopeptidlinker umfassen,
 - d) Ligieren der cDNA-Abschnitte zu scFv-cDNAs,
 - e) Ligieren der scFv-cDNAs in einen Phagemid-Vektor und Transformieren eines Wirtsbakteriums mit dem Phagemid-Vektor,
 - f) Isolieren von Phagen, die an die in Schritt a) verwendete(n) Zellpopulation(en) binden, durch Selektion,
 - g) Isolieren von zellspezifischen Phagen aus den in Schritt f) erhaltenen Phagen, die nur an die in Schritt a) verwendete(n) Zellpopulation(en) binden, durch Selektion,
 - h) Ausschneiden der scFv-codierenden DNA-Fragmente aus den in Schritt g) erhaltenen zellspezifischen Phagen und Ligieren in einen psi-negativen retroviralen Env-Expressionsvektor,
 - i) Transformieren des erhaltenen Env-scFv-Expressionsvektors in eine Verpackungszelle, und
 - j) Isolieren der von der Verpackungszelle sezernierten retroviralen Vektoren.
2. Verfahren nach Anspruch 1, wobei die in Schritt g) erhaltenen zellspezifischen Phagen vereinzelt werden
3. Verfahren nach Anspruch 1 oder 2, wobei die Schritte f) und/oder g) mindestens einmal wiederholt werden.
4. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 3, weiter umfassend den Schritt:

k) Isolieren der von der Verpackungszelle sezernierten retroviralen Vektoren, die die Zellen der Zellpopulation(en) transduzieren durch Selektion.

- 5 5. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei das Säugetier ausgewählt ist aus der Gruppe Maus, Ratte, Meerschweinchen, Kaninchen, Ziege oder Schaf.
6. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 4, wobei die Zellpopulation(en) ausgewählt ist aus der Gruppe Mensch, Maus, Ratte, Schaf, Rind oder Schwein.
- 10 7. Verfahren nach Anspruch 6, wobei die Zellpopulation(en) ausgewählt ist (sind) aus der Gruppe, umfassend T-Zellen, Epithelzellen, Muskelzellen, hämatopoietische Zellen, Stammzellen, neurale Zellen, Karzinomzellen oder Leberzellen.
- 15 8. Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 7, wobei das env-Gen des psi-negativen retroviralen Env-Expressionsvektors vom Milznekrosevirus (SNV) stammt.
9. Verfahren nach Anspruch 8, wobei der Expressionsvektor der Vektor mit der Bezeichnung pTC53 ist.
- 20 10. Retrovirale Vektoren, erhältlich nach dem Verfahren nach einem der Ansprüche 1 bis 9.
11. Verwendung der retroviralen Vektoren nach Anspruch 10 als Arzneimittel.
- 25 12. Verwendung des Vektors nach Anspruch 10 zur Herstellung eines Arzneimittels zur somatischen Gentherapie, Impftherapie oder Diagnostik.
13. Verwendung des Vektors nach Anspruch 10 zur Herstellung eines Arzneimittels zur Therapie der Cystischen Fibrose, des ADA-Mangels, der chronischen Granulomatose oder der HIV-1 Infektion.
- 30 14. Retrovirale Verpackungszelle zur Gewinnung der retroviralen Vektoren nach Anspruch 10, transformiert sowohl mit einem oder mehreren psi-negativen

Expressionskonstrukt(en), die die gag-, pol- und/oder env-Genprodukte exprimieren, als auch mit einem psi-negativen Env-scFv-Expressionskonstrukt nach Anspruch 1 h).

- 5 15. Retrovirale Verpackungszelle nach Anspruch 14, ferner umfassend ein psi-positives Expressionskonstrukt, umfassend ein Nukleinsäurefragment, das in die durch den retroviralen Vektor zu transduzierende Zelle eingeführt werden soll.
- 10 16. Retrovirale Verpackungszelle nach Anspruch 15, wobei das Nukleinsäurefragment ein therapeutisches Gen oder dessen DNA-Fragment und/oder ein Reportergen oder ein Resistenzgen umfaßt.
- 15 17. Retrovirale Verpackungszelle nach Anspruch 16, wobei das therapeutische Gen oder dessen Nukleinsäurefragment das CFTR-, phox91-, ADA-, IL-16-, p53- oder revM10-Gen oder ein oder mehrere Impfgene z. B. rekombinantes gp120 und IL-16 umfaßt.
18. Retrovirale Verpackungszelle nach Anspruch 16, wobei das Reportergen β -Galaktosidase, "Green Fluorescent Protein", Luciferase und das Resistenzgen Neomycin umfaßt.

Transduktion von T-Zellen mit [SNV-scFv-Env]-Vektoren

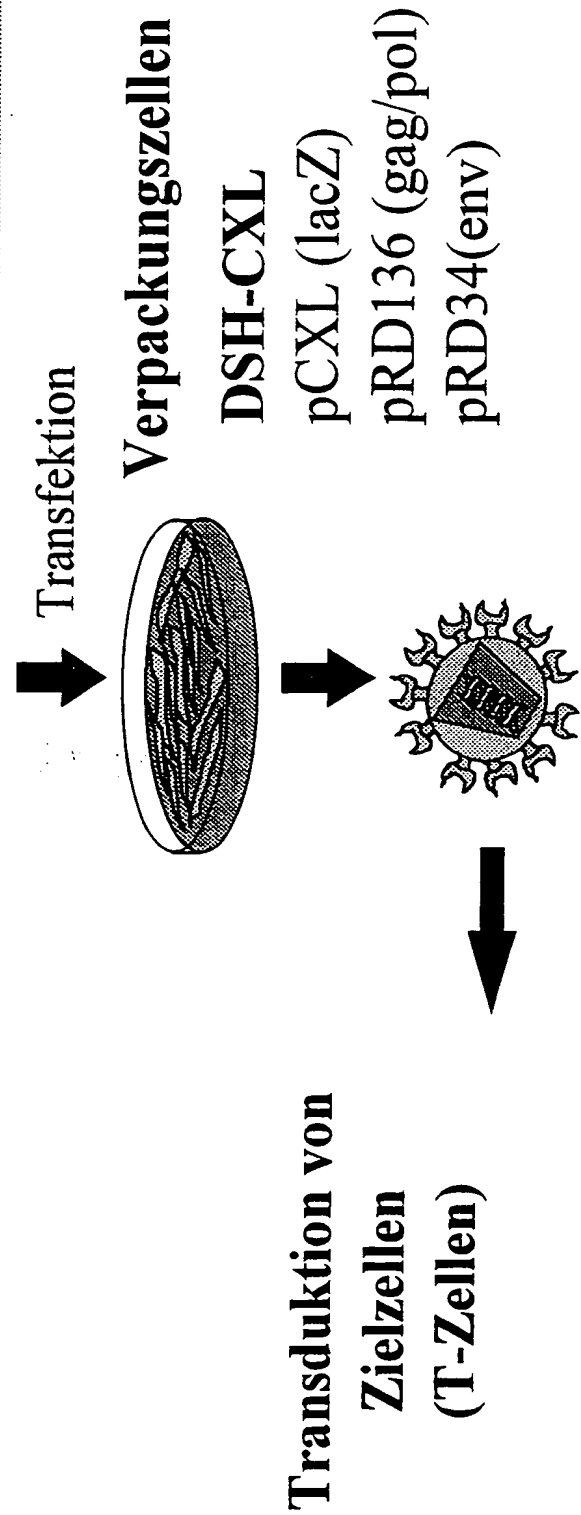
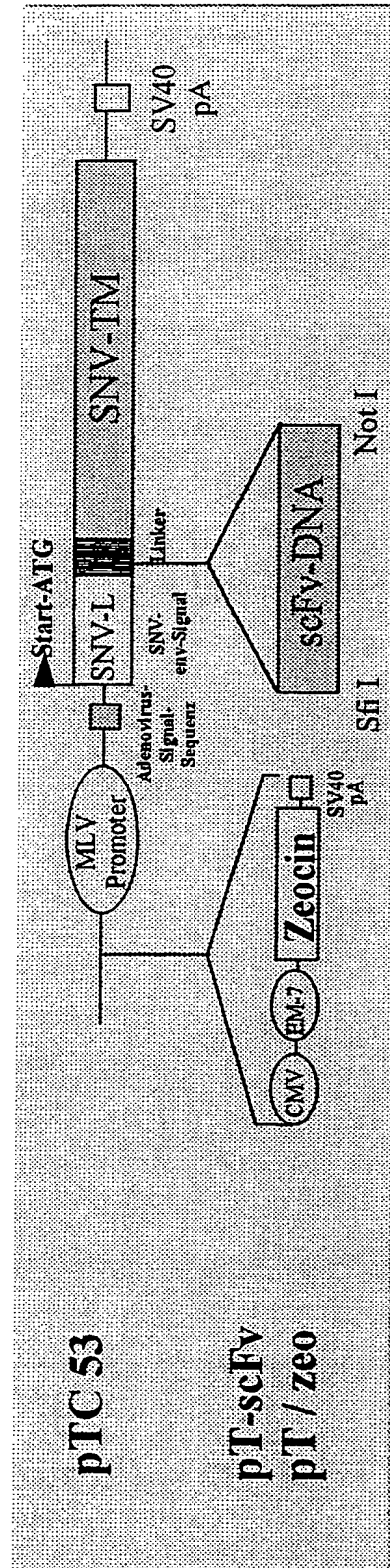


Abb. 1

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Herstellen einer SNV-scFv-Env Vektor-Bibliothek

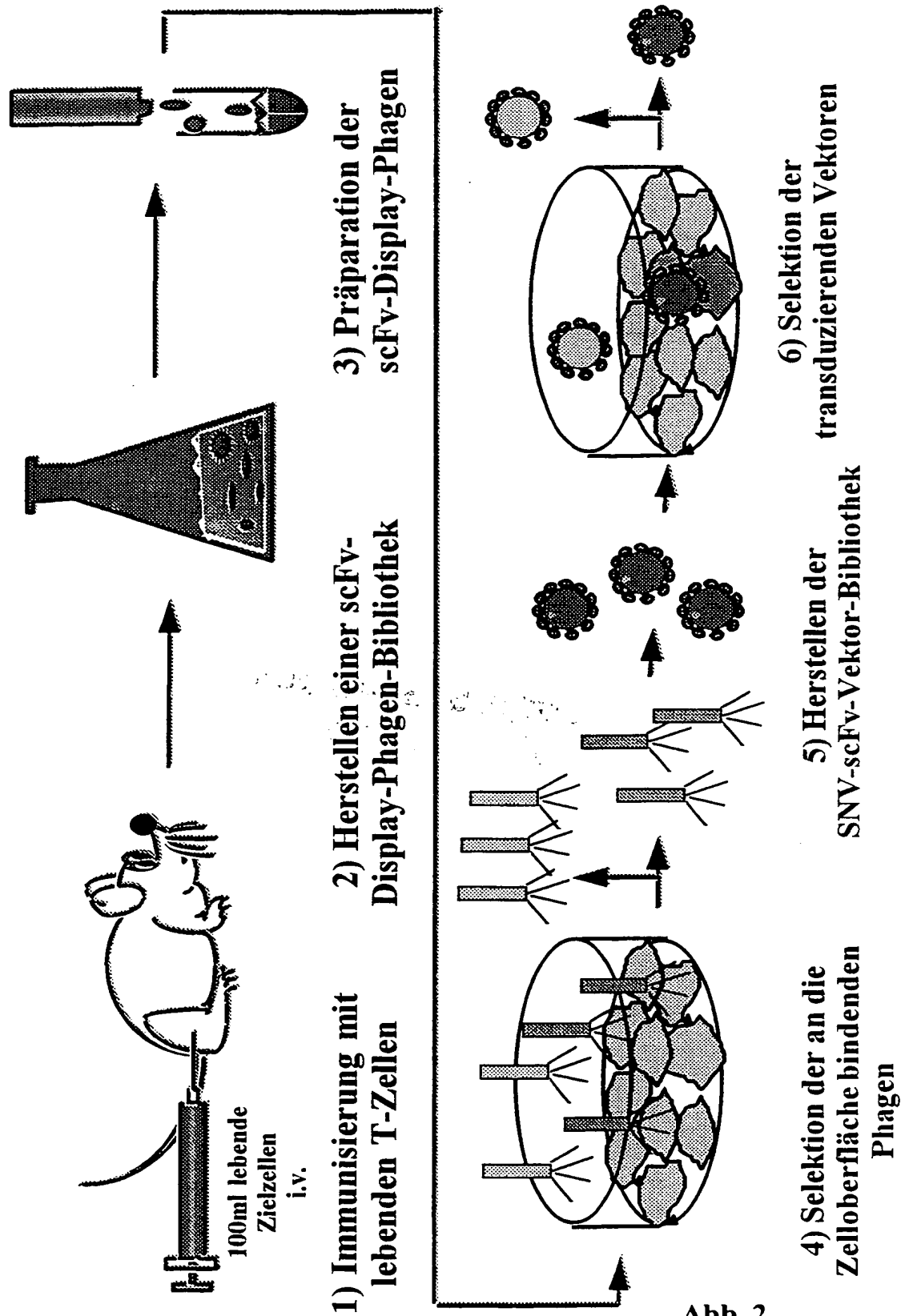


Abb. 2

THIS PAGE BLANK (USPTO:

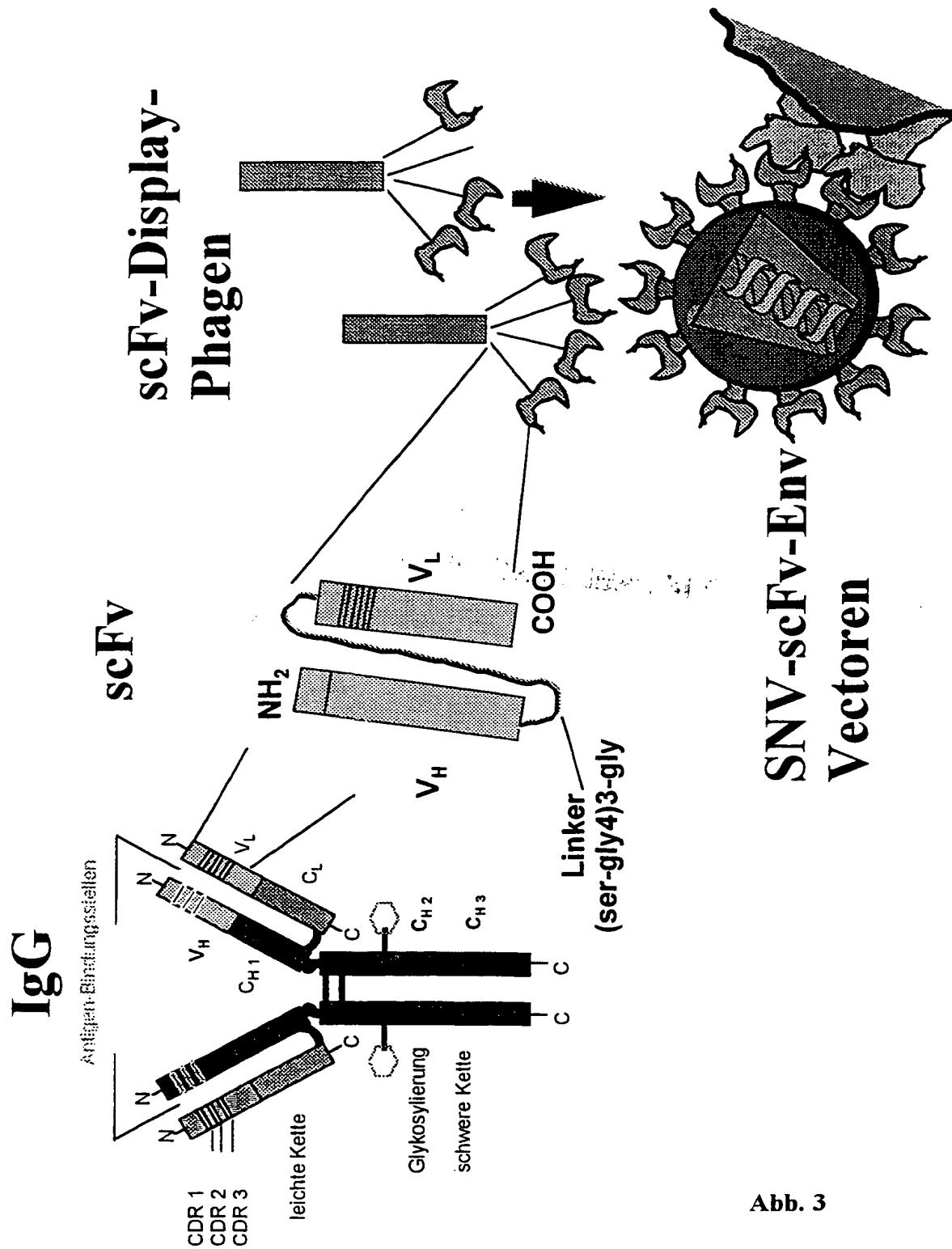


Abb. 3

THIS PAGE BLANK (USPTO)

pTC53.SEQ [1 to 4776] -> Genes

DNA sequence 4776 b.p. GAATTCGGGTAC ... ACGACGGGCAGT Linear

[illegible]

Абб. 4 А

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Abb. 4 B

THIS PAGE BLANK (USPTO)

SEQUENZPROTOKOLL

(1) ALLGEMEINE ANGABEN:

(i) ANMELDER:

- (A) NAME: Bundesrepublik Deutschland letztvertreten durch
den Präsidenten des Paul-Ehrlich-Instituts
- (B) STRASSE: Paul-Ehrlich-Str. 51-59
- (C) ORT: Langen
- (E) LAND: Deutschland
- (F) POSTLEITZAHL: 63225

(ii) BEZEICHNUNG DER ERFINDUNG: Zellspezifische retrovirale Vektoren
mit Antikörperdomänen und Verfahren zu ihrer Herstellung für den
selektiven Gentransfer

(iii) ANZAHL DER SEQUENZEN: 31

(iv) COMPUTER-LESBARE FASSUNG:

- (A) DATENTRÄGER: Floppy disk
- (B) COMPUTER: IBM PC compatible
- (C) BETRIEBSSYSTEM: PC-DOS/MS-DOS
- (D) SOFTWARE: PatentIn Release #1.0, Version #1.30 (EPA)

(v) DATEN DER FRÜHEREN ANMELDUNG:

ANMELDENUMMER: DE 197 52 854.6
ANMELDETAG: 28-11-1997

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 1:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

- (A) LÄNGE: 4776 Basenpaare
- (B) ART: Nucleotid
- (C) STRANGFORM: Doppelstrang
- (D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKÜLS: Sonstige Nucleinsäure

(iii) HYPOTHETISCH: NEIN

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 1:

GAATTCCCGT ACGAGCCATA GATAAAATAA AAGATTTTAT TTAGTCTCCA GAAAAAGGGG	60
GGAATGAAAG ACCCCACCTG TAGGTTTGGC AAGCTAGCTT AAGTAACGCC ATTTTGCAAG	120
GCATGGAAAA ATACATAACT GAGAATAGAG AAGTTCAGAT CAAGGTCAGG AACAGATGGA	180
ACAGCTGAAT ATGGGCCCAA CAGGATATCT GTGGTAAGCA GTTCCTGCCC CGGCTCAGGG	240
CCAAGAACAG ATGGAACAGC TGAATATGGG CCAAACAGGA TATCTGTGGT AAGCAGTTCC	300

THIS PAGE BLANK (USPTO)

TGCCCCGGCT	CAGGGCCAAG	AACAGATGGT	CCCCAGATGC	GGTCCAGCCC	TCAGCAGTTT	360
CTAGAGAACC	ATCAGATGTT	TCCAGGGTGC	CCCAAGGACC	TGAAATGACC	CTGTGCCTTA	420
TTTGAACATA	CCAATCAGTT	CGCTTCTCGC	TTCTGTTCGC	GCGCTTCTGC	TCCCCGAGCT	480
CAATAAAAGA	GCCCACAACC	CCTCACTCGG	GGGCCAGTC	CTCCGATTGA	CTGAGTCGCC	540
CGGGTGGGGG	AGCTCGCTGT	TGGGCTCGCG	GTTGAGGACA	AACTCTTCGC	GGTCTTTCCA	600
GTACTCTTGG	ATCGGAAACC	CGTCGGCCTC	CGAACGGTAC	TCCGCCACCG	AGGGACCTGA	660
GCGAGTCCGC	ATCGACCGGA	TCGGAAAACC	TCTCGAGAAA	GGCGTCTAAC	CAGTCACAGT	720
CGCAAGGTAG	GCTGAGCACC	GTGGCCGGGC	GGCACGGGTG	GCGGTCGGGG	TTGTTTCTGG	780
CGGAGGTGCT	GCTGATGATG	TAATTAAGTA	GGCGGTCTTG	AGACGGCGAT	GGTCGAGGTG	840
AGGTGTGGCA	GGCTTGAGAT	CTGGCCATAC	ACTTGAGTGA	CAATGACATC	CACTTTGCCT	900
TTCTCTCCAC	AGGTGTCCAC	TCCCAGGTCC	AACCGGATCC	GAGCTCCACC	GCGGTAAAGG	960
TCGCTGGGAA	GACCCCGTGG	ATCCACCACT	CTCGACTCAA	GAAAGCTCCT	GACAACCAAG	1020
AAGAATGGAC	TGTCTCACCA	ACCTCCGATC	CGCTGAGGGT	AAAGTTGACC	AGGCGAGCAA	1080
AATCCTAATT	CTCCTTGTGG	CTTGGTGGGG	GTTTGGGACC	ACTGCCGAAG	TTTCGACTGC	1140
CGGCTCCGGG	GGCGGTGGTT	CTGGTGGTGG	TTCTGGTGGT	GGTGGTTCTG	GTGGTGGTGG	1200
TTCTGGCGCC	AGCCCACTCC	AGTTTATCCC	CCTGCTTGTC	GGTCTAGGGA	TTTCAGGGGC	1260
TACACTTGCT	GGTGGAACGG	GGCTTGGGGT	CTCCGTTTAC	ACTTATCACA	AGCTCTCTAA	1320
TCAATTGATT	GAAGATGTCC	AGGCTCTTTC	AGGGACCATC	AATGACCTAC	AGGACCAGAT	1380
TGACTCCCTG	GCTGAGGTTG	TCTTACAAAA	TAGAAGAGGG	TTAGACCTAT	TGACTGCCGA	1440
ACAAGGAGGA	ATATGTCTCG	CACTCCAGGA	GAAGTGTGTG	TTTTACGCTA	ACAAGTCGGG	1500
TATCGTACGT	GACAAGATCC	GAAAACCTCA	AGAGGACCTT	ATCGAGAGAA	AACGTGCACT	1560
GTACGACAAC	CCCCTGTGGA	GCGGCTTGAA	CGGCTTCCTT	CCATATTTGC	TACCCTTGTT	1620
AGGCCCCCTG	TTTGGGCTCA	TATTGTTTCT	GACCCCTCGG	CCGTGCATTA	TGAAGACCCT	1680
GACTCGCATT	ATACATGACA	AAATTCAGGC	AGTAAAATCC	TAGCACTAGT	CCCACAGTAC	1740
AAGCCACTCC	CAACAGAGAT	GGATACCCTA	GGGGTCCGAT	GGTCTAAGAA	TTCTCGAGTC	1800
TAAGATCGAT	CGAATTCCTA	GGTCAATGAT	TTGACCAGAA	TGTACAAGAG	CAGTGGGGAA	1860
TGTGGGAGGG	GCTTACGAAG	GCCTTAAGTG	ACTAGGTACC	CGATCCAGAC	ATGATAAGAT	1920

THIS PAGE BLANK (USPTO)

ACATTGATGA	GTTTGGACAA	ACCACAACATA	GAATGCAGTG	AAAAAAATGC	TTTATTTGTG	1980
AAATTTGTGA	TGCTATTGCT	TTATTTGTAA	CCATTATAAG	CTGCAATAAA	CAAGTTAACA	2040
ACAACAATTG	CATTCATTTT	ATGTTTCAGG	TTCAGGGGGA	GGTGTGGGAG	GTTTTTTAAA	2100
GCAAGTAAAA	CCTCTACAAA	TCAAGCTGGG	CAAGCTAGAT	CTAGCTTGGC	GTAATCATGG	2160
TCATAGCTGT	TTCCTGTGTG	AAATTGTTAT	CCGCTCACAA	TTCCACACAA	CATACGAGCC	2220
GGAAGCATAA	AGTGTAAGC	CTGGGGTGCC	TAATGAGTGA	GCTAACTCAC	ATTAATTGCG	2280
TTGCGCTCAC	TGCCCCTTTT	CCAGTCGGGA	AACCTGTCGT	GCCAGCTGCA	TTAATGAATC	2340
GGCCAACGCG	CGGGGAGAGG	CGGTTTGCGT	ATTGGGCGCT	CTTCCGCTTC	CTCGCTCACT	2400
GACTCGCTGC	GCTCGGTCGT	TCGGCTGCGG	CGAGCGGTAT	CAGCTCACTC	AAAGGCGGTA	2460
ATACGGTTAT	CCACAGAATC	AGGGGATAAC	GCAGGAAAGA	ACATGTGAGC	AAAAGGCCAG	2520
CAAAGGCCA	GGAACCGTAA	AAAGGCCGCG	TTGCTGGCGT	TTTTCCATAG	GCTCCGCCCC	2580
CCTGACGAGC	ATCACAAAAA	TCGACGCTCA	AGTCAGAGGT	GGCGAAACCC	GACAGGACTA	2640
TAAAGATACC	AGGCGTTTCC	CCCTGGAAGC	TCCCTCGTGC	GCTCTCCTGT	TCCGACCCTG	2700
CCGCTTACCG	GATACCTGTC	CGCCTTTCTC	CCTTCGGGAA	GCGTGGCGCT	TTCTCAATGC	2760
TCACGCTGTA	GGTATCTCAG	TTCGGTGTAG	GTCGTTGCGT	CCAAGCTGGG	CTGTGTGCAC	2820
GAACCCCCCG	TTCAGCCCGA	CCGCTGCGCC	TTATCCGGTA	ACTATCGTCT	TGAGTCCAAC	2880
CCGGTAAGAC	ACGACTTATC	GCCACTGGCA	GCAGCCACTG	GTAACAGGAT	TAGCAGAGCG	2940
AGGTATGTAG	GCGGTGCTAC	AGAGTTCTTG	AAGTGGTGGC	CTAACTACGG	CTACACTAGA	3000
AGGACAGTAT	TTGGTATCTG	CGCTCTGCTG	AAGCCAGTTA	CCTTCGGAAA	AAGAGTTGGT	3060
AGCTCTTGAT	CCGGCAAACA	AACCACCGCT	GGTAGCGGTG	GTTTTTTTGT	TTGCAAGCAG	3120
CAGATTACGC	GCAGAAAAAA	AGGATCTCAA	GAAGATCCTT	TGATCTTTTC	TACGGGGTCT	3180
GACGCTCAGT	GGAACGAAAA	CTCACGTTAA	GGGATTTTGG	TCATGAGATT	ATCAAAAAGG	3240
ATCTTCACCT	AGATCCTTTT	AAATTAAAAA	TGAAGTTTTA	AATCAATCTA	AAGTATATAT	3300
GAGTAAACTT	GGTCTGACAG	TTACCAATGC	TTAATCAGTG	AGGCACCTAT	CTCAGCGATC	3360
TGTCTATTTT	GTTTCATCCAT	AGTTGCCTGA	CTCCCCGTCG	TGTAGATAAC	TACGATACGG	3420
GAGGGCTTAC	CATCTGGCCC	CAGTGCTGCA	ATGATACCGC	GAGACCCACG	CTCACC GGCT	3480

THIS PAGE BLANK (USPT)

CCAGATTTAT CAGCAATAAA CCAGCCAGCC GGAAGGGCCG AGCGCAGAAG TGGTCCTGCA	3540
ACTTTATCCG CCTCCATCCA GTCTATTAAT TGTGCGCGG AAGCTAGAGT AAGTAGTTCCG	3600
CCAGTTAATA GTTTGCGCAA CGTTGTTGCC ATTGCTACAG GCATCGTGGT GTCACGCTCG	3660
TCGTTTGGA TGGCTTCATT CAGCTCCGGT TCCCAACGAT CAAGGCGAGT TACATGATCC	3720
CCCATGTTGT GCAAAAAAGC GGTAGCTCC TTCGGTCCTC CGATCGTTGT CAGAAAGTAAG	3780
TTGGCCGCAG TGTATCACT CATGGTTATG GCAGCACTGC ATAATTCTCT TACTGTCATG	3840
CCATCCGTAA GATGCTTTTC TGTGACTGGT GAGTACTCAA CCAAGTCATT CTGAGAATAG	3900
TGTATGCGGC GACCGAGTTG CTCTTGCCCG GCGTCAATAC GGGATAATAC CGCGCCACAT	3960
AGCAGAACTT TAAAAGTGCT CATCATTTGA AAACGTTCTT CGGGGCGAAA ACTCTCAAGG	4020
ATCTTACCGC TGTGAGATC CAGTTCGATG TAACCCACTC GTGCACCCAA CTGATCTTCA	4080
GCATCTTTTA CTTTCACCAG CGTTTCTGGG TGAGCAAAAA CAGGAAGGCA AAATGCCGCA	4140
AAAAAGGGAA TAAGGGCGAC ACGGAAATGT TGAATACTCA TACTCTTCCT TTTTCAATAT	4200
TATTGAAGCA TTTATCAGGG TTATTGTCTC ATGAGCGGAT ACATATTTGA ATGTATTTAG	4260
AAAAATAAAC AAATAGGGGT TCCGCGCACA TTTCCCGGAA AAGTGCCACC TGACGTCTAA	4320
GAAACCATTA TTATCATGAC ATTAACCTAT AAAAATAGGC GTATCACGAG GCCCTTTCGT	4380
CTCGCGCGTT TCGGTGATGA CCGTGAAAAC CTCTGACACA TGCAGCTCCC GGAGACGGTC	4440
ACAGCTTGTC TGTAAGCGGA TGCCGGGAGC AGACAAGCCC GTCAGGGCGC GTCAGCGGGT	4500
GTTGGCGGGT GTCGGGGCTG GCTTAACTAT GCGGCATCAG AGCAGATTGT ACTGAGAGTG	4560
CACCATATGC GGTGTGAAAT ACCGCACAGA TGCGTAAGGA GAAAATACCG CATCAGGCGC	4620
CATTCGCCAT TCAGGCTGCG CAACTGTTGG GAAGGGCGAT CCGTGCGGGC CTCTTCGCTA	4680
TTACGCCAGC TGGCGAAAGG GGGATGTGCT GCAAGGCGAT TAAGTTGGGT AACGCCAGGG	4740
TTTTCCAGT CACGACGTTG TAAAACGACG GCCAGT	4776

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 2:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 12 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 2:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Met Lys Asp Pro Thr Cys Arg Phe Gly Lys Leu Ala
5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 3:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 21 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 3:

Met Glu Lys Tyr Ile Thr Glu Asn Arg Glu Val Gln Ile Lys Val Arg
5 10 15

Asn Arg Trp Asn Ser
20

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 4:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 8 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 4:

Met Gly Gln Thr Gly Tyr Leu Trp

5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 5:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 13 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 5:

Met Glu Gln Leu Asn Met Gly Gln Thr Gly Tyr Leu Trp

5

10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 6:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 12 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 6:

Met Val Pro Arg Cys Gly Pro Ala Leu Ser Ser Phe

5

10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 7:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 10 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 7:

Met Phe Pro Gly Cys Pro Lys Asp Leu Lys

5

10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 8:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 15 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 8:

Met Val Glu Val Arg Cys Gly Arg Leu Glu Ile Trp Pro Tyr Thr

5

10

15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 9:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

- (A) LÄNGE: 24 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 9:

Met Thr Ser Thr Leu Pro Phe Ser Pro Gln Val Ser Thr Pro Arg Ser
 5 10 15
 Asn Arg Ile Arg Ala Pro Pro Arg
 20

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 10:
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 232 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 10:

Met Asp Cys Leu Thr Asn Leu Arg Ser Ala Glu Gly Lys Val Asp Gln
 5 10 15
 Ala Ser Lys Ile Leu Ile Leu Leu Val Ala Trp Trp Gly Phe Gly Thr
 20 25 30
 Thr Ala Glu Val Ser Thr Ala Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
 35 40 45
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Ala Ser Pro
 50 55 60
 Val Gln Phe Ile Pro Leu Leu Val Gly Leu Gly Ile Ser Gly Ala Thr
 65 70 75 80
 Leu Ala Gly Gly Thr Gly Leu Gly Val Ser Val His Thr Tyr His Lys
 85 90 95
 Leu Ser Asn Gln Leu Ile Glu Asp Val Gln Ala Leu Ser Gly Thr Ile
 100 105 110
 Asn Asp Leu Gln Asp Gln Ile Asp Ser Leu Ala Glu Val Val Leu Gln
 115 120 125
 Asn Arg Arg Gly Leu Asp Leu Leu Thr Ala Glu Gln Gly Gly Ile Cys
 130 135 140
 Leu Ala Leu Gln Glu Lys Cys Cys Phe Tyr Ala Asn Lys Ser Gly Ile
 145 150 155 160
 Val Arg Asp Lys Ile Arg Lys Leu Gln Glu Asp Leu Ile Glu Arg Lys
 165 170 175
 Arg Ala Leu Tyr Asp Asn Pro Leu Trp Ser Gly Leu Asn Gly Phe Leu
 180 185 190
 Pro Tyr Leu Leu Pro Leu Leu Gly Pro Leu Phe Gly Leu Ile Leu Phe
 195 200 205
 Leu Thr Leu Gly Pro Cys Ile Met Lys Thr Leu Thr Arg Ile Ile His
 210 215 220
 Asp Lys Ile Gln Ala Val Lys Ser
 225 230

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 11:
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 14 Aminosäuren

THIS PAGE BLANK (USPTO)

```

      (B) ART: Aminosäure
      (D) TOPOLOGIE: linear
      (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein
      (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 11:
Met Asp Thr Leu Gly Val Arg Trp Ser Lys Asn Ser Arg Val
      5                               10

```

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 12:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 15 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 12:

Met Tyr Lys Ser Ser Gly Glu Cys Gly Arg Gly Leu Arg Arg Pro

5 10 15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 13:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 16 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 13:

Met Ile Arg Tyr Ile Asp Glu Phe Gly Gln Thr Thr Arg Met Gln

5 10 15

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:14:
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 4 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 14:

Met Leu Tyr Leu

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 15:

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 - (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
 - (B) ART: Aminosäure
 - (D) TOPOLOGIE: linear
- (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein
- (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 15:

Met Leu Leu Leu Tyr Leu
5

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 16:
(i) SEQUENZKENNZEICHEN:
(A) LÄNGE: 12 Aminosäuren
(B) ART: Aminosäure
(D) TOPOLOGIE: linear

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 16:

Met Phe Gln Val Gln Gly Glu Val Trp Glu Val Phe
5 10

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 17:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 26 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 17:

Met Val Ile Ala Val Ser Cys Val Lys Leu Leu Ser Ala His Asn Ser
5 10 15
Thr Gln His Thr Ser Arg Lys His Lys Val
20 25

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 18:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 49 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 18:

Met Ser Glu Leu Thr His Ile Asn Cys Val Ala Leu Thr Ala Arg Phe
5 10 15
Pro Val Gly Lys Pro Val Val Pro Ala Leu Met Asn Arg Pro Thr
20 25 30
Arg Gly Glu Arg Arg Phe Ala Tyr Trp Ala Leu Phe Arg Phe Leu Ala
35 40 45
His

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 19:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 4 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 19:

Met Leu Thr Leu

(2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 20:

(i) SEQUENZKENNZEICHEN:

(A) LÄNGE: 9 Aminosäuren

(B) ART: Aminosäure

(D) TOPOLOGIE: linear

(ii) ART DES MOLEKUELS: Protein

(xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 20:

Met Arg Leu Ser Lys Arg Ile Phe Thr

THIS PAGE BLANK (USPTO)

5

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 21:
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 11 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 21:
 Met Ser Lys Leu Gly Leu Thr Val Thr Asn Ala
 5 10

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO:22:
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 70 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 22:

Met Arg Cys Glu Ile Pro His Arg Cys Val Arg Arg Lys Tyr Arg Ile
 5 10 15
 Arg Arg His Ser Pro Phe Arg Leu Arg Asn Cys Trp Glu Gly Arg Ser
 20 25 30
 Val Arg Ala Ser Ser Leu Leu Arg Gln Leu Ala Lys Gly Gly Cys Ala
 35 40 45
 Ala Arg Arg Leu Ser Trp Val Thr Pro Gly Phe Ser Gln Ser Arg Arg
 50 55 60
 Cys Lys Thr Thr Ala Ser
 65 70

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 23:
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 88 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 23:

Met Ile Pro Arg Asp Pro Arg Ser Pro Ala Pro Asp Leu Ser Ala Ile
 5 10 15
 Asn Gln Pro Ala Gly Arg Ala Glu Arg Arg Ser Gly Pro Ala Thr Leu
 20 25 30
 Ser Ala Ser Ile Gln Ser Ile Asn Cys Cys Arg Glu Ala Arg Val Ser
 35 40 45
 Ser Ser Pro Val Asn Ser Leu Arg Asn Val Val Ala Ile Ala Thr Gly
 50 55 60
 Ile Val Val Ser Arg Ser Ser Phe Gly Met Ala Ser Phe Ser Ser Gly
 65 70 75 80
 Ser Gln Arg Ser Arg Arg Val Thr
 85

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 24:

THIS PAGE BLANK (USPTO)

11

- (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 56 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 24:

```

Met Leu Cys Lys Lys Ala Val Ser Ser Phe Gly Pro Pro Ile Val Val
      5                      10                      15
Arg Ser Lys Leu Ala Ala Val Leu Ser Leu Met Val Met Ala Ala Leu
      20                      25                      30
His Asn Ser Leu Thr Val Met Pro Ser Val Arg Cys Phe Ser Val Thr
      35                      40                      45
Gly Glu Tyr Ser Thr Lys Ser Phe
      50                      55

```

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 25:
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 49 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 25:

```

Met Arg Arg Pro Ser Cys Ser Cys Pro Ala Ser Ile Arg Asp Asn Thr
      5                      10                      15
Ala Pro His Ser Arg Thr Leu Lys Val Leu Ile Ile Gly Lys Arg Ser
      20                      25                      30
Ser Gly Arg Lys Leu Ser Arg Ile Leu Pro Leu Leu Arg Ser Ser Ser
      35                      40                      45
Met

```

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 26:
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 6 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 26:

```

Met Pro Gln Lys Arg Glu
      5

```

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 27:
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 27 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 27:

```

Met Leu Asn Thr His Thr Leu Pro Phe Ser Ile Leu Leu Lys His Leu
      5                      10                      15

```

THIS PAGE BLANK (USPTO)

Ser Gly Leu Leu Ser His Glu Arg Ile His Ile
20 25

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 28:
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 5 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 28:

Met Tyr Leu Glu Lys
5

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 29:
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 26 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 29:

Met Thr Leu Thr Tyr Lys Asn Arg Arg Ile Thr Arg Pro Phe Arg Leu
5 10 15
Ala Arg Phe Gly Asp Asp Gly Glu Asn Leu
20 25

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 30:
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 11 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 30:

Met Gln Leu Pro Glu Thr Val Thr Ala Cys Leu
5 10

- (2) ANGABEN ZU SEQ ID NO: 31:
 (i) SEQUENZKENNZEICHEN:
 (A) LÄNGE: 31 Aminosäuren
 (B) ART: Aminosäure
 (D) TOPOLOGIE: linear
 (ii) ART DES MOLEKUELS: Protein
 (xi) SEQUENZBESCHREIBUNG: SEQ ID NO: 31:

Met Pro Gly Ala Asp Lys Pro Val Arg Ala Arg Gln Arg Val Leu Ala
5 10 15
Gly Val Gly Ala Gly Leu Thr Met Arg His Gln Ser Arg Leu Tyr
20 25 30

THIS PAGE BLANK (USPTO)

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 98/03543

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

IPC 6 C12N15/86 C12N5/10 A61K48/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC 6 C12N A61K C07K

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practical, search terms used)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category *	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 95 23846 A (UNIV MEDICINE & DENTISTRY OF N) 8 September 1995 see the whole document	10-18
X	CHU T. H. ET AL.: "Toward highly efficient cell-type- specific gene transfer with retroviral vectors displaying single-chain antibodies." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 71, no. 1, January 1997, pages 720-725, XP002103150 cited in the application see the whole document	10-18

-/--



Further documents are listed in the continuation of box C.



Patent family members are listed in annex.

* Special categories of cited documents :

- "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
- "E" earlier document but published on or after the international filing date
- "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
- "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
- "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

- "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
- "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
- "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art.
- "Z" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

25 May 1999

Date of mailing of the international search report

04/06/1999

Name and mailing address of the ISA

European Patent Office, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl.
Fax: (+31-70) 340-3016

Authorized officer

Mandl, B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International Application No

PCT/DE 98/03543

C.(Continuation) DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CHISWELL D. J. ET AL.: "PHAGE ANTIBODIES: WILL NEW 'COLICLONAL' ANTIBODIES REPLACE MONOCLONAL ANTIBODIES?" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, vol. 10, no. 3, 1 March 1992, pages 80-84, XP000249633 cited in the application see the whole document ---	1-9
A	LANG I. M. ET AL.: "Recombinant rabbit Fab with binding activity to type-1 plasminogen activator inhibitor derived from a phage-display library against human alpha-granules" GENE, vol. 172, no. 2, 26 June 1996, pages 295-298, XP002103151 see the whole document ---	1-9
A	WO 93 01288 A (DEUTSCHES KREBSFORSCH) 21 January 1993 see the whole document ---	1-9
A	EP 0 104 014 A (SLOAN KETTERING INST CANCER) 28 March 1984 see the whole document ---	1-9
T	JIANG A. ET AL.: "Cell-type-specific gene transfer into human cells with retroviral vectors that display single-chain antibodies." JOURNAL OF VIROLOGY, vol. 72, no. 12, December 1998, pages 10148-10156, XP002103152 see the whole document -----	10-18

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/DE 98/03543

Box I Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 1 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.:
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
Observation: Although Claim(s) 11 relate(s) to a method for treatment of the human or animal body, the search was carried out and was based on the cited effects of the compound/ composition.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box II Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 2 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. ☐ As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. ☐ As all searchable claims could be searched without effort justifying an additional fee, this Authority did not invite payment of any additional fee.
3. ☐ As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. ☐ No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

Remark on Protest

- ☐ The additional search fees were accompanied by the applicant's protest.
☐ No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International Application No

PCT/DE 98/03543

Patent document cited in search report	Publication date	Patent family member(s)	Publication date
WO 9523846 A	08-09-1995	CA 2184354 A	08-09-1995
		EP 0786010 A	30-07-1997
		JP 10501403 T	10-02-1998
		US 5869331 A	09-02-1999
WO 9301288 A	21-01-1993	DE 4122599 A	04-02-1993
		EP 0547201 A	23-06-1993
		JP 6500930 T	27-01-1994
		US 5849500 A	15-12-1998
EP 0104014 A	28-03-1984	US 4642291 A	10-02-1987
		CA 1210346 A	26-08-1986

A. KLASSIFIZIERUNG DES ANMELDUNGSGEGENSTANDES

IPK 6 C12N15/86 C12N5/10 A61K48/00

Nach der Internationalen Patentklassifikation (IPK) oder nach der nationalen Klassifikation und der IPK

B. RECHERCHIERTE GEBIETE

Recherchierter Mindestprüfstoff (Klassifikationssystem und Klassifikationssymbole)

IPK 6 C12N A61K C07K

Recherchierte aber nicht zum Mindestprüfstoff gehörende Veröffentlichungen, soweit diese unter die recherchierten Gebiete fallen

Während der internationalen Recherche konsultierte elektronische Datenbank (Name der Datenbank und evtl. verwendete Suchbegriffe)

C. ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie ^a	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
X	WO 95 23846 A (UNIV MEDICINE & DENTISTRY OF N) 8. September 1995 siehe das ganze Dokument ---	10-18
X	CHU T. H. ET AL.: "Toward highly efficient cell-type- specific gene transfer with retroviral vectors displaying single-chain antibodies." JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 71, Nr. 1, Januar 1997, Seiten 720-725, XP002103150 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument --- -/-	10-18

☒ Weitere Veröffentlichungen sind der Fortsetzung von Feld C zu entnehmen

☒ Siehe Anhang Patentfamilie

^a Besondere Kategorien von angegebenen Veröffentlichungen :

"A" Veröffentlichung, die den allgemeinen Stand der Technik definiert, aber nicht als besonders bedeutsam anzusehen ist

"E" älteres Dokument, das jedoch erst am oder nach dem internationalen Anmeldedatum veröffentlicht worden ist

"L" Veröffentlichung, die geeignet ist, einen Prioritätsanspruch zweifelhaft erscheinen zu lassen, oder durch die das Veröffentlichungsdatum einer anderen im Recherchenbericht genannten Veröffentlichung belegt werden soll oder die aus einem anderen besonderen Grund angegeben ist (wie ausgeführt)

"O" Veröffentlichung, die sich auf eine mündliche Offenbarung, eine Benutzung, eine Ausstellung oder andere Maßnahmen bezieht

"P" Veröffentlichung, die vor dem internationalen Anmeldedatum, aber nach dem beanspruchten Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist

"T" Spätere Veröffentlichung, die nach dem internationalen Anmeldedatum oder dem Prioritätsdatum veröffentlicht worden ist und mit der Anmeldung nicht kollidiert, sondern nur zum Verständnis des der Erfindung zugrundeliegenden Prinzips oder der ihr zugrundeliegenden Theorie angegeben ist

"X" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann allein aufgrund dieser Veröffentlichung nicht als neu oder auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden

"Y" Veröffentlichung von besonderer Bedeutung; die beanspruchte Erfindung kann nicht als auf erfinderischer Tätigkeit beruhend betrachtet werden, wenn die Veröffentlichung mit einer oder mehreren anderen Veröffentlichungen dieser Kategorie in Verbindung gebracht wird und diese Verbindung für einen Fachmann naheliegend ist

"&" Veröffentlichung, die Mitglied derselben Patentfamilie ist

Datum des Abschlusses der internationalen Recherche

25. Mai 1999

Absendedatum des internationalen Recherchenberichts

04/06/1999

Name und Postanschrift der Internationalen Recherchenbehörde

Europäisches Patentamt, P.B. 5818 Patentlaan 2
NL - 2280 HV Rijswijk
Tel. (+31-70) 340-2040, Tx. 31 651 epo nl,
Fax: (+31-70) 340-3016

Bevollmächtigter Bediensteter

Mandl, B

C.(Fortsetzung) ALS WESENTLICH ANGESEHENE UNTERLAGEN

Kategorie	Bezeichnung der Veröffentlichung, soweit erforderlich unter Angabe der in Betracht kommenden Teile	Betr. Anspruch Nr.
A	CHISWELL D. J. ET AL.: "PHAGE ANTIBODIES: WILL NEW 'COLICLONAL' ANTIBODIES REPLACE MONOCLONAL ANTIBODIES?" TRENDS IN BIOTECHNOLOGY, Bd. 10, Nr. 3, 1. März 1992, Seiten 80-84, XP000249633 in der Anmeldung erwähnt siehe das ganze Dokument ---	1-9
A	LANG I. M. ET AL.: "Recombinant rabbit Fab with binding activity to type-1 plasminogen activator inhibitor derived from a phage-display library against human alpha-granules" GENE, Bd. 172, Nr. 2, 26. Juni 1996, Seiten 295-298, XP002103151 siehe das ganze Dokument ---	1-9
A	WO 93 01288 A (DEUTSCHES KREBSFORSCH) 21. Januar 1993 siehe das ganze Dokument ---	1-9
A	EP 0 104 014 A (SLOAN KETTERING INST CANCER) 28. März 1984 siehe das ganze Dokument ---	1-9
T	JIANG A. ET AL.: "Cell-type-specific gene transfer into human cells with retroviral vectors that display single-chain antibodies." JOURNAL OF VIROLOGY, Bd. 72, Nr. 12, Dezember 1998, Seiten 10148-10156, XP002103152 siehe das ganze Dokument -----	10-18

INTERNATIONALER RECHERCHENBERICHT

internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/03543

Feld I Bemerkungen zu den Ansprüchen, die sich als nicht recherchierbar erwiesen haben (Fortsetzung von Punkt 2 auf Blatt 1)

Gemäß Artikel 17(2)a) wurde aus folgenden Gründen für bestimmte Ansprüche kein Recherchenbericht erstellt:

1. ☒ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Gegenstände beziehen, zu deren Recherche die Behörde nicht verpflichtet ist, nämlich
Bemerkung: Obwohl der(die) Anspruch(üche) 11
sich auf ein Verfahren zur Behandlung des menschlichen/tierischen
Körpers bezieht(en), wurde die Recherche durchgeführt und gründete sich
auf die angeführten Wirkungen der Verbindung/Zusammensetzung.
2. ☐ Ansprüche Nr.
weil sie sich auf Teile der internationalen Anmeldung beziehen, die den vorgeschriebenen Anforderungen so wenig entsprechen,
daß eine sinnvolle internationale Recherche nicht durchgeführt werden kann, nämlich
3. ☐ Ansprüche Nr.
weil es sich dabei um abhängige Ansprüche handelt, die nicht entsprechend Satz 2 und 3 der Regel 6.4 a) abgefaßt sind.

Feld II Bemerkungen bei mangelnder Einheitlichkeit der Erfindung (Fortsetzung von Punkt 3 auf Blatt 1)

Die internationale Recherchenbehörde hat festgestellt, daß diese internationale Anmeldung mehrere Erfindungen enthält:

1. ☐ Da der Anmelder alle erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht auf alle recherchierbaren Ansprüche.
2. ☐ Da für alle recherchierbaren Ansprüche die Recherche ohne einen Arbeitsaufwand durchgeführt werden konnte, der eine zusätzliche Recherchegebühr gerechtfertigt hätte, hat die Behörde nicht zur Zahlung einer solchen Gebühr aufgefordert.
3. ☐ Da der Anmelder nur einige der erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren rechtzeitig entrichtet hat, erstreckt sich dieser internationale Recherchenbericht nur auf die Ansprüche, für die Gebühren entrichtet worden sind, nämlich auf die Ansprüche Nr.
4. ☐ Der Anmelder hat die erforderlichen zusätzlichen Recherchegebühren nicht rechtzeitig entrichtet. Der internationale Recherchenbericht beschränkt sich daher auf die in den Ansprüchen zuerst erwähnte Erfindung; diese ist in folgenden Ansprüchen erfaßt:

Bemerkungen hinsichtlich eines Widerspruchs

- ☐ Die zusätzlichen Gebühren wurden vom Anmelder unter Widerspruch gezahlt.
- ☐ Die Zahlung zusätzlicher Recherchegebühren erfolgte ohne Widerspruch.

INTERNATIONALER RESEARCHBERICHT

Angaben zu Veröffentlichungen, die zur selben Patentfamilie gehören

Internationales Aktenzeichen

PCT/DE 98/03543

Im Recherchenbericht angeführtes Patentdokument	Datum der Veröffentlichung	Mitglied(er) der Patentfamilie	Datum der Veröffentlichung
WO 9523846 A	08-09-1995	CA 2184354 A	08-09-1995
		EP 0786010 A	30-07-1997
		JP 10501403 T	10-02-1998
		US 5869331 A	09-02-1999
WO 9301288 A	21-01-1993	DE 4122599 A	04-02-1993
		EP 0547201 A	23-06-1993
		JP 6500930 T	27-01-1994
		US 5849500 A	15-12-1998
EP 0104014 A	28-03-1984	US 4642291 A	10-02-1987
		CA 1210346 A	26-08-1986